

Hafsan

MIKROBIOLOGI ANALITIK



Hafsan

MIKROBIOLOGI ANALITIK



Alauddin University Press

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang:

Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini ke dalam bentuk apapun tanpa izin tertulis dari penerbit

All Rights Reserved

MIKROBIOLOGI ANALITIK

Penulis:

Hafsan

Editor:

Fatmawati Nur

Cetakan: I 2014

x + 242 halaman, 14 cm x 21 cm

ISBN : 978-602-237-889-1

Alauddin University Press

Kampus I : Jalan Sultan Alauddin No. 63 Makassar

Kampus II : Jalan Sultan Alauddin No. 36 Samata – Gowa

Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang:

Dilarang memperbanyak atau memindahkan sebagian atau seluruh isi buku ini ke dalam bentuk apapun tanpa izin tertulis dari penerbit

All Rights Reserved

MIKROBIOLOGI ANALITIK

Penulis:

Hafsan

Editor:

Fatmawati Nur

Cetakan: I 2014

x + 242 halaman, 14 cm x 21 cm

ISBN : 978-602-237-889-1

Alauddin University Press

Kampus I : Jalan Sultan Alauddin No. 63 Makassar

Kampus II : Jalan Sultan Alauddin No. 36 Samata – Gowa

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah, penulis panjatkan rasa syukur kepada Allah SWT karena hanya dengan Taufiq dan HidayahNya sehingga penyusunan buku ini telah terselesaikan dan kini dapat dijadikan sebagai salah satu solusi kurangnya referensi tentang teknik analisa mikrobiologi dalam naskah berbahasa indonesia.

Buku ini menyajikan berbagai teknik-teknik analisa mikrobiologi sebagai kunci dasar dari berbagai tinjauan kehidupan mikroba. Adapun materi dari buku ini tidak saja diambil dari sumber pustaka yang ada saja, tetapi juga berdasarkan pengalaman penulis dan rekan-rekan serta pengalaman para pakar di bidang mikrobiologi. Dengan demikian kami berharap, buku ini dapat berguna bagi mahasiswa, praktikan, dosen, peneliti bahkan praktisi sebagai pedoman dan pegangan untuk mengembangkan diri dalam upaya meluaskan wawasan tentang praktik analisa mikroba.

Perlu diakui bahwa materi dalam buku ini masih banyak kekeliruan atau kesalahan, untuk itu penulis mengharapkan saran-saran yang konstruktif demi kesempurnaan tulisan berikutnya. Sebagai buku teks, buku ini masih sangat jauh dari kesempurnaan, namun demikian dalam upaya mengantisipasi perkembangan mikrobiologi dalam kurikulum biologi, maka keberadaan buku ini dapat dijadikan sebagai salah satu sumber rujukan dalam pembelajaran mikrobiologi.

Penyelesaian buku ini tak lepas dari peran serta berbagai pihak, sehingga penulis menghaturkan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada semua pihak terutama rekan-rekan sejawat dan teristimewa suami dan kedua ananda tercinta yang tak pernah henti memberikan dukungan atas tugas yang penulis emban. Semoga segenap aktivitas kita bernilai ibadah di sisiNya. Amin

Penulis

DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR	2
DAFTAR ISI	3
DAFTAR TABEL	5
DAFTAR GAMBAR	6
BAB I PENDAHULUAN	7
A. Ruang Lingkup Mikrobiologi Analitik	7
B. Tujuan Analisa Mikrobiologi	8
BAB II PREPARASI DALAM ANALISA MIKROBIOLOGI..	17
A. Ruang Pengerjaan Analisa Mikrobiologi	17
1. Ruang tidak steril	18
2. Ruang semi steril	19
3. Ruang steril	20
B. Alat-Alat dalam Analisa Mikrobiologi	21
C. Keselamatan Kerja dalam Analisa Mikrobiologi	37
BAB III TEKNIK ASEPTIS	69
A. Pengertian, Tujuan dan Macam-macam Sterilisasi	69
B. Sterilisasi Ruang Kerja	75
C. Sterilisasi Medium	76
D. Bekerja Tanpa Kontaminasi	77
BAB IV MEDIA DALAM ANALISA MIKROBIOLOGI	82
A. Pengertian dan dan Fungsi Media	82
B. Nama-nama Media	82
C. Bahan-bahan Media Pertumbuhan	83
1. Sumber nutrisi	83
2. Komposisi media pertumbuhan	84
D. Macam-macam Media	86
1. Berdasarkan sifat fisik	86
2. Berdasarkan Komposisi bahan	87
3. Berdasarkan tujuan	87
E. Hal-hal penting dalam pembuatan media	89
F. Penanganan Commercial Dehydrated Media	95
G. Ilustrasi Pembuatan Media	96

BAB V SAMPEL DALAM ANALISA MIKROBIOLOGI ..	101
A. Peraturan Umum Pengambilan Sampling	101
B. Alat yang Digunakan dalam Sampling	103
C. Teknik Pengambilan dan Preparasi Sampel Berdasarkan Jenis Sampel	104
1. Sampel padat	104
2. Sampel cair	119
3. Sampel udara	123
D. Daya Tahan Sampel (<i>sample hold time</i>) dan Penyimpanan Sampel	145
E. Perlakuan pada Sampel Sebelum Diuji	146
BAB VI TEKNIK PLATE COUNT (HITUNGAN CAWAN	
A. Metode Tuang (Pour Plate)	150
B. Metode Permukaan (Spread Plate)	151
C. Cara Menghitung Koloni	151
D. Standar Penghitungan	152
E. Penghitungan Total Bakteri	155
F. Penghitungan Total Spora Bakteri	155
G. Penghitungan Total Kapang-Khamir	156
BAB VII TEKNIK FERMENTASI TABUNG BERSERI (MPN:MOST PROBABLE NUMBER)	
A. Prinsip yang digunakan dalam metode MPN	159
B. Aspek peluang dalam metode MPN	161
C. Kaidah pemilihan tabung positif dan cara pelaporannya.	162
D. Hubungan antara MPN dan CFU	167
BAB VIII TEKNIK MEMBRAN FILTER (MF)	
A. Pendahuluan	176
B. Peralatan pada Teknik Filtrasi Membran (FM)	185
C. Cara Kerja	187
D. Permasalahan yang Umum Terjadi	192
DAFTAR PUSTAKA	
RIWAYAT HIDUP PENULIS	

DAFTAR TABEL

No	Judul Tabel	Hal
1	Indikator penentuan kualitas bahan pangan dan lingkungan	9
2	Sterility testing kualitas media	85
3	Trubleshooting kesalahan dalam pembuatan media	87
4	Perbandingan penghancuran dengan blender dan stomacher	104
5	Konversi MPN ke CFU	172

DAFTAR GAMBAR

No	Judul Gambar	Hal
1	Interpretasi hasil uji dengan metode 2 class plan	5
2	Interpretasi hasil uji dengan metode 3 class plan	6
3	Ilustrasi pembuatan media	89
4	Cara pengambilan sampel secara umum	96
5	Cara pengambilan sampel tanah, kompos dan lumpur	98
6	Hand soil auger untuk sampling tanah dan lumpur	99
7	Pengambilan sampel daging berupa ikan	99
8	Pengambilan sampel gula atau beras pada karung	100
9	Preparasi sampel padat	102
10	Alat Penghancur sampel padat	104
11	Preparasi sampel seperti sayur, daun dan buah	107
12	Preparasi sampel botol kosong	108
13	Sampel permukaan padat dengan teknik swab	111
14	Pengambilan sampel cair	114
15	Pengambilan sampel air sungai, air kolam, danau, waduk, pantai dan laut	115
16	Metode pengambilan sampel mikroorganisme di udara dengan Impingement	123
17	Metode pengambilan sampel mikroorganisme di udara dengan Impaction	127
18	Prinsip kerja alat Andersen sampler	128
19	Surface Air System	129
20	Centrifugal sampler	130
21	Bagan alir pengerjaan metode MPN	162
22	Kemungkinan kombinasi MPN	163
23	Konversi MPN ke CFU	175
24	Teknik membran filtrasi	179
25	Penanaman membran pada media agar	180
26	Hasil isolasi dengan metode membran filter	183
27	Hubungan ukuran pori kertas membran dengan ukuran sel berbagai macam jenis mikroba	184
28	Rangkaian alat dengan membran filter	186
29	Tahap-tahap prosedur teknik filtrasi membran	187
30	Perubahan integritas struktur kertas membran oleh alkohol	189
31	Pertumbuhan koloni yang bermasalah	195

BAB I PENDAHULUAN

A. Ruang Lingkup Mikrobiologi Analitik

Populasi mikroorganisme di alam sekitar kita sangat besar dan kompleks. Beratus-ratus spesies berbagai mikroorganisme berada disekitar kita. Mikroorganisme ada yang menguntungkan dan ada yang merugikan. Mikroorganisme yang merugikan yaitu mikroorganisme yang dapat menyebabkan infeksi, menghasilkan racun dan merusak bahan dengan cara menyebabkan pembusukan maupun menguraikan bahan-bahan. Terdapatnya mikroorganisme dalam sediaan farmasi, makanan, minuman sebagai kontaminan, dapat disebabkan oleh cara pengolahan yang tidak bersih dan sehat, cara pengepakan yang kurang bagus, cara penyimpanan yang tidak baik dan lain-lain. Sedangkan sumbernya dapat berasal dari udara, tanah, air, peralatan yang digunakan dalam pengolahan, atau pekerja yang melakukan proses pembuatan.

Makanan, minuman, obat tradisional, sediaan non steril, serta kosmetik merupakan suatu sediaan yang berasal dari hewan, tumbuhan, mineral, maupun dari zat-zat kimia sintetik. Pada umumnya sediaan-sediaan tersebut diproduksi oleh industri secara besar-besaran dan biasanya memakan waktu yang cukup lama dalam produksi, penyimpanan, distribusi dan akhirnya sampai ke tangan konsumen. Sehingga kemungkinan terjadinya pertumbuhan mikroorganisme di dalamnya sangat besar.

Mikrobiologi analitik merupakan cabang mikrobiologi yang spesifik membahas dan melakukan pemeriksaan bahan secara mikrobiologis yaitu deteksi, penghitungan dan pengujian mikroorganisme pada suatu bahan tertentu. Adapun yang menjadi sasaran pengerjaan analisa mikroorganisme ada dua, yaitu:

- Mikroorganisme sebagai mikroorganisme bahan uji (mikroorganisme uji): untuk pengujian berdasarkan respon mikroorganisme terhadap sampel
- Mikroorganisme sebagai kontaminan dalam produk farmasi, pangan dan kosmetik

Pemeriksaan mikrobiologis terhadap suatu bahan dalam hal ini jumlah maupun jenis mikroorganisme yang ada di dalam suatu sampel atau bahan, dapat memberikan informasi mengenai mutu bahan bakunya, keadaan kebersihan pada pengolahannya dan keefektifan metode pengawetannya. Jumlah mikroorganisme pada bahan pangan sangat bervariasi tergantung dari jenis bahan itu sendiri dan kondisi lingkungannya.

B. Tujuan Analisa Mikrobiologi

Jenis pengujian yang diperlukan untuk masing-masing produk tidak sama. Untuk produk makanan diuji cemaran mikroorganismenya. Uji angka lempeng total merupakan tolak ukur mikrobiologis untuk mengetahui kebersihan pengolahan dan penanganan produk makanan dan minuman maupun produk lainnya yang juga merupakan suatu indikasi layak atau tidak layaknya suatu produk untuk digunakan. Beberapa tujuan dilakukannya analisa mikrobiologi antara lain:

- Menentukan jenis dan sumber kontaminan
- Evaluasi proses sanitasi, penanganan bahan dasar dan proses pengolahan
- Menentukan kualitas mikrobiologis makanan
- Menentukan umur simpan makanan

Suatu cara penentuan apakah suatu bahan pangan tersebut layak dikonsumsi/aman atau tidak yang dilihat dari sudut pandang mikrobiologis telah diperkenalkan oleh ICMSF (*International Commission on Microbiological Specifications for Foods*) pada tahun 1962. Hal ini dapat membantu menjaga kualitas pangan dan mengendalikan penyakit yang berasal dari bahan pangan. Perencanaan ini disebut dengan *sampling plan*.

Secara singkat sampling plan adalah suatu pernyataan berdasarkan persyaratan/kriteria secara mikrobiologis untuk menentukan derajat penerimaan keamanan pangan berdasarkan jumlah sampel yang sesuai dan dengan metode yang spesifik. Untuk menyederhanakan pengertian diatas maka dapat digambarkan pada kasus berikut: dalam produksi daging ayam untuk dipasarkan, tentunya terdapat pertanyaan apakah daging ayam hasil produksi perusahaan A cukup aman dikonsumsi?, untuk menjawab pertanyaan tersebut harus membutuhkan suatu ambang batas dimana dapat ditentukan pernyataan yang jelas antara aman atau tidak aman dikonsumsi. Lalu muncul pertanyaan lanjutan: seberapa banyak jumlah mikroorganisme yang diizinkan ada dalam ayam tersebut dan masih tetap aman dikonsumsi?, jika akan diuji maka seberapa banyakkah jumlah ayam yang harus diambil?, uji apakah yang paling mencerminkan jumlah mikroorganisme yang ada?. Pertanyaan-pertanyaan tersebut dapat dijawab jika diterapkan sampling plan dalam pengujian mikrobiologis daging ayam ini sehingga didapatkan kesimpulan bahwa semua daging ayam produksi perusahaan A layak atau aman dikonsumsi atau tidak.

Dalam pelaksanaan sampling plan membutuhkan suatu kriteria mikrobiologi. Kriteria mikrobiologi (*microbiological criteria*) adalah suatu batas persyaratan yang dapat menunjukkan keterimaan suatu *batch*/partai berdasarkan jumlah mikroorganisme tertentu dari suatu jenis bahan pangan tertentu. Kriteria mikrobiologi mencakup:

- Jumlah unit sampel yang diuji (misalnya 5 sampel, 10 sampel dll)
- Jenis mikroorganisme uji (mis. *Enterobacter*, *Coliform* dll.)
- Batas jumlah bakteri uji yang dapat diterima (mis. 10^5 CFU/ml)
- Jenis bahan yang diuji (mis. daging, kacang-kacangan, air dll.)
- Metode yang dipakai (misalnya TPC, MPN dll.)
- Rencana kelas yang dipilih (2 class plan dan 3 class plan)

Dalam sampling plan terdapat dua jenis cara penentuan derajat penerimaan yang disebut dengan class plan yaitu 2 class plan dan 3 class plan.

2 class plan; yaitu suatu sampling plan untuk menentukan apakah sampel tertentu memenuhi kriteria mikrobiologis atau tidak. Hasil akhirnya adalah sampel dapat diterima/layak dikonsumsi atau tidak dapat diterima/tidak layak dikonsumsi.

2 class plan ini nilainya tergantung kepada:

n = jumlah unit sampel minimal yang disyaratkan

c = jumlah maksimal uji tiap unit yang hasilnya melebihi kriteria

m = jumlah maksimal kelompok mikroorganisme terkait yang diuji (CFU/ml atau CFU/g)

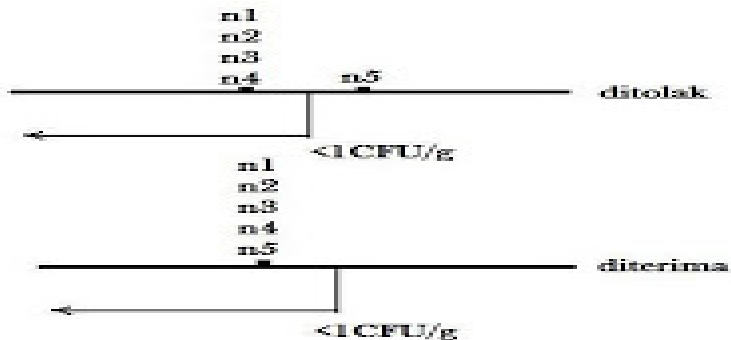
Interpretasinya adalah:

jika hasil uji dari n sebanyak lebih dari c yang melebihi nilai m maka tidak dapat diterima/tidak aman

jika hasil uji dari n sebanyak (maksimal) c atau kurang dari c yang melebihi nilai m maka dapat diterima/aman.

2 class plan ini umumnya dipakai pada penentuan pengujian patogen berbahaya seperti *Salmonella*. Umumnya untuk pengujian ini nilai m adalah nol pada suatu ukuran sampel tertentu, misalnya 25 g. Dengan demikian maka keberadaan patogen dalam sampel dapat diartikan sebagai < 1 CFU/25 g. Cara ini lebih mirip dengan pengujian *presence-absence*.

Contoh a: untuk bahan susu cair maupun bubuk pada pengujian *Salmonella* memiliki $n = 5$, $c = 0$ dan $m = 0$ CFU/g. Parameter tersebut mengartikan bahwa untuk pengujian *Salmonella* pada susu jumlah minimal unit sampel yang diuji adalah 5, dari ke 5 sampel tersebut setelah diuji tidak boleh satu pun positif *Salmonella*, dan batas maksimal jumlah bakteri *Salmonella* pada sampel harus 0 atau < 1 CFU/g. jika ada satu sampel positif *Salmonella* maka secara keseluruhan ditolak atau tidak aman



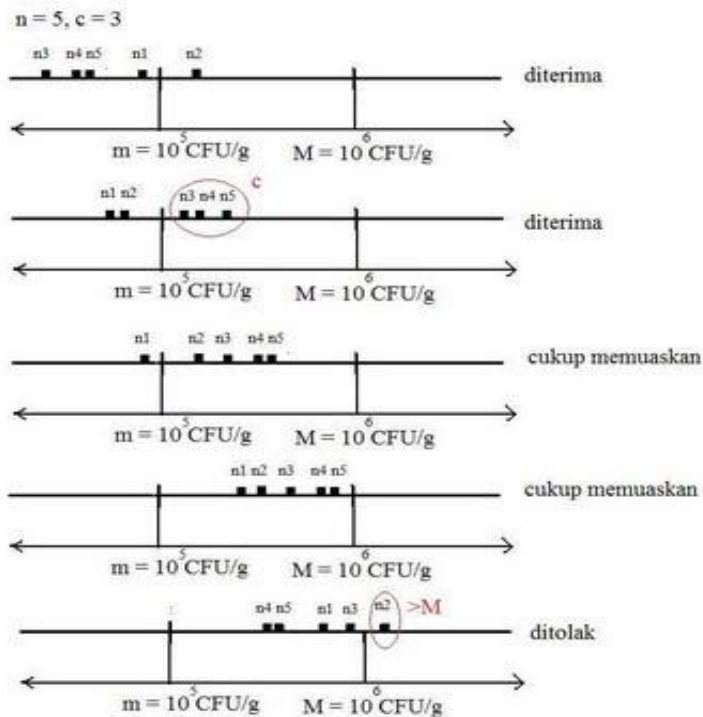
Gambar 1. Interpretasi hasil uji dengan metode **2 class plan**

3 class plan; merupakan suatu cara yang berfungsi untuk menentukan suatu sampel memenuhi kriteria mikrobiologis atau tidak. Hasil akhirnya adalah sampel memuaskan, memenuhi kriteria (dapat diterima) atau tidak memenuhi kriteria (tidak dapat diterima). Selain n , c dan m , 3 class plan ini juga dipengaruhi oleh variabel M . M adalah jumlah maksimum jenis mikroorganisme yang diuji (CFU/ml atau CFU/g) yang diperbolehkan untuk keamanan pangan (jumlah maksimal yang digunakan untuk membagi batas diterima dan ditolak). 3 class plan ini umumnya diterapkan untuk jenis mikroorganisme indikator yang tidak berbahaya atau patogen seperti uji TPC, *coliform* dll.

Interpretasinya adalah:

- Jika maksimal hasil uji sebanyak c dari sejumlah n melebihi nilai m tapi tidak melebihi nilai M , sedangkan sampel lainnya tidak melebihi nilai m maka dapat diterima atau aman.
- Jika hasil pengujian semua unit (n) sampel nilainya lebih rendah dari M maka cukup memuaskan dan masih masuk kisaran aman.
- Jika ≥ 1 unit sampel hasil uji dari n melebihi nilai M maka tidak dapat diterima atau tidak aman.

Contoh a: untuk bahan pangan daging mentah pada pengujian TPC memiliki $n = 5$, $c = 3$, $m = 105$ CFU/g, dan $M = 106$ CFU/g. Parameter tersebut mengartikan bahwa untuk pengujian TPC pada daging mentah jumlah minimal unit sampel yang diuji adalah 5. Jika dari ke 5 sampel tersebut setelah diuji maksimal sebanyak 3 unit sampel menghasilkan angka TPC lebih dari 105 CFU/g tetapi kurang dari 106 CFU/g maka diartikan dapat diterima. Jika dari semua 5 sampel tersebut setelah diuji dihasilkan angka TPC kurang dari 106CFU/g maka diartikan masih dalam kisaran aman dan cukup memuaskan. Jika hanya satu atau lebih dari satu dari ke 5 sampel tersebut setelah diuji menghasilkan angka TPC lebih dari 106 CFU/g maka diartikan tidak dapat diterima atau tidak aman.



Gambar 2. Interpretasi hasil uji dengan metode **3 class plan**

Untuk meningkatkan kualitas pangan maka dapat memperbesar n dan memperkecil c dan mengurangi m . Namun semua parameter di atas nilainya telah dibakukan oleh ICMSF untuk setiap jenis bahan pangan. Nilai n , m , c dan M untuk setiap jenis bahan pangan dapat dilihat pada *Microorganism in Foods 2 Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Application 2nd editions*.

Indikator Mikrobiologis

Pada suatu bahan pangan atau pengujian aspek lingkungan tentunya membutuhkan pendeteksian suatu mikroorganisme spesifik yang bersifat berbahaya. Tujuannya yaitu untuk mengetahui seberapa jumlahnya atau resiko yang mungkin ditimbulkan pada bahan pangan dan lingkungan. Namun banyak hambatan jika pengujian ini dilakukan, misalnya belum tentu terdapat metode yang sesuai untuk pengujiannya, jika dilakukan secara rutin maka biayanya akan sangat besar, membutuhkan waktu lama dan mungkin terlalu sulit secara teknis. Oleh karena itu untuk menggambarkan keberadaan mikroorganisme penting atau berbahaya tersebut dibuat metode pendeteksian mikroorganisme lain yang kehadirannya mengindikasikan mikroorganisme yang dituju. Mikroorganisme lain ini disebut indikator mikrobiologis. Indikator mikrobiologis tidak selalu berbentuk mikroorganisme, dapat juga hasil metabolit atau enzim yang dihasilkannya. Jadi indikator mikrobiologis (*microbiological indicator*) adalah suatu kelompok mikroorganisme atau hasil metabolitnya yang ada dalam bahan pangan atau lingkungan dan mampu memberikan tingkatan gambaran mengenai potensi kualitas, higienitas atau masalah keamanan pangan.

Istilah organisme indeks (*index organism*) untuk menggambarkan indikasi yang berkaitan dengan kesehatan, sedangkan indikator mikrobiologis lebih mengarah kepada kegagalan suatu proses industri sehingga mikroorganisme indikator tersebut muncul. Istilah organisme pengganti (*surrogate organism*) sangat bertolak belakang dengan mikroorganisme indikator jika ditinjau dari dasar fungsinya. *Surrogate organism* adalah mikroorganisme pengganti yang memiliki karakteristik yang mirip dengan mikroorganisme target yang

fungsinya untuk mengevaluasi efek atau respon suatu perlakuan yang ditujukan untuk mikroorganisme target. Misalnya endospora *Clostridium sporogenes* digunakan dalam validasi proses sterilisasi yang ditujukan untuk *Clostridium botulinum* (endospora kedua jenis tersebut memiliki karakteristik yang mirip).

Beberapa syarat pemilihan kelompok mikroorganisme yang dijadikan indikator adalah:

- Mikroorganisme indikator umumnya bukan merupakan patogen.
- Metode pendeteksiannya sebaiknya cepat, sederhana dan tidak memakan banyak biaya.
- Mikroorganisme indikator sebaiknya telah diidentifikasi karakteristiknya dengan baik sehingga dapat dengan mudah dideskriminasikan dari sampel.
- Jika mungkin, metode pengujiannya mampu untuk menghitung (*enumerative*) mikroorganisme indikator tersebut sehingga tingkatan kontaminasinya dapat diketahui.
- Habitat alami mikroorganisme indikator sebaiknya sama dengan mikroorganisme target.
- Mikroorganisme indikator sebaiknya ada jika mikroorganisme target ada dan tidak ada jika mikroorganisme target tidak ada.
- Harus terdapat suatu korelasi antara mikroorganisme indikator dengan target, umumnya level mikroorganisme indikator lebih tinggi dari pada mikroorganisme target.
- Sebaiknya mikroorganisme indikator lebih resisten dibandingkan dengan mikroorganisme target.
- Ketika difungsikan sebagai *organisms surrogate* maka harus memiliki karakteristik yang sama dengan organisme target.

Tabel berikut merangkum tentang indikator umum yang digunakan untuk menentukan kualitas dari suatu bahan pangan atau lingkungan.

Tabel 1. Indikator penentuan kualitas bahan pangan dan lingkungan

Pendekatan Umum	Uji Spesifik	Dasar dari Pengujian
Berdasarkan kultur	<i>Aerobic Plate Count</i>	Jumlah total bakteri mesofilik, patogen, dan hidup (<i>viable</i>). Kondisi pertumbuhan dapat juga dimanipulasi untuk mikroba spesifik, seperti anaerob, psikrotrof dll.
	<i>Yeast and Mold</i>	Jumlah total yeast dan mold yang dapat hidup
	<i>Heat Resistant Mold</i>	Pegujian terhadap proses sterilisasi panas
	<i>Staphylococci</i>	Mikroba ini banyak terdapat pada kulit dan sangat mudah dibunuh oleh proses sterilisasi. Keberadaannya mengindikasikan kontaminasi dari manusia dan kegagalan proses sterilisasi
	<i>Fecal Coliform</i>	Mikroba ini melimpah pada jalur gastrointestinal dari hewan berdarah panas. Keberadaannya mengindikasikan adanya kontaminasi dari feses.
	<i>Escherichia coli</i>	Mikroba ini melimpah di jalur gastrointestinal dari hewan mamalia berdarah panas. Keberadaannya mengindikasikan adanya kontaminasi dari feses dan patogen.
	<i>Salmonella</i>	Mikroba yang dapat hadir pada bahan pangan setelah pemrosesan atau kontaminasi silang yang disebarkan melalui partikel udara atau debu.

	<i>Listeria</i> spp.	Mikroba yang biasa terdapat pada tempat atau lingkungan dingin yang mengandung air. Kehadirannya mengindikasikan bahwa sanitasi tidak dilakukan dengan baik.
Mikroskopis	<i>Direct Microscopic Count</i>	Jumlah total Mikroba <i>viable</i> dan <i>non-viable</i>
Hasil metabolis/ enzim	<i>Howard Mold Count</i>	Jumlah filament jamur
	<i>ATP Bioluminescence</i>	Pengukuran jumlah molekul ATP yang mengindikasikan adanya bahan organik atau mikroba pada proses sanitasi.
	<i>Diacetyl</i>	Hasil metabolisme fermentasi bakteri asam laktat dan keberadaannya mengindikasikan adanya fermentasi.
	<i>Total Volatile Bases, Total Volatile Nitrogen, Trimethylamine</i>	Produk metabolisme degradasi asam amino yang umumnya berasosiasi dengan bakteri yang ditemukan pada produk ikan dan daging.
	<i>Thermonuclease test</i>	<i>Thermostable deoxyribonuclease</i> (TNase) adalah enzim dari <i>Staphylococcus</i> . Kehadirannya mengindikasikan adanya kontaminasi enterotoksin.
	<i>Alkaline Phosphatase</i>	Secara alami terdapat pada susu dan menjadi indikator proses pasteurisasi

BAB II. PREPARASI DALAM ANALISA MIKROBIOLOGI

A. Ruang Pengerjaan Analisa Mikrobiologi

Laboratorium merupakan faktor yang sangat penting dalam pengerjaan analisa mikrobiologi. Dalam menentukan lokasi yang tepat untuk laboratorium analisa mikrobiologi, beberapa aspek harus menjadi perhatian. Hal ini sangat erat kaitannya dengan sifat dan ciri analisa mikrobiologi yang mengharuskan kondisi aseptik dan lingkungan terkontrol. Untuk laboratorium analisa mikrobiologi yang ideal maka lokasi laboratorium tersebut harus di lingkungan yang bersih, bebas polusi, tanpa keterbatasan air, dan yang terpenting dilengkapi dengan prasarana transportasi utilities (air, gas, dan listrik) yang memadai. Dalam arti laboratorium tersebut tidak berlokasi di daerah berdebu, contohnya di dekat pabrik semen atau berasap kendaraan bermotor seperti tempat parkir mobil, terminal, maupun stasiun kereta api. Laboratorium sebaiknya juga tidak berlokasi di daerah yang berangin kencang, terlalu kering (langka sumber air), atau dekat dengan pembuangan sampah, karena di tempat-tempat tersebut pengontrolan kontaminasi sulit dilakukan.

Ukuran dan jumlah ruangan yang diperlukan untuk sebuah laboratorium analisa mikrobiologi dapat bervariasi, tergantung pada kebutuhannya. Fasilitas laboratorium analisa mikrobiologi dibagi menjadi beberapa bagian yang fungsinya satu dengan yang lainnya berbeda dan persyaratannya pun berbeda pula. Laboratorium analisa mikrobiologi harus dirancang sedemikian rupa, karena ada bagian-bagian atau ruangan harus dalam keadaan steril atau bebas mikroorganisme. Sebagaimana diketahui bahwa tujuan utama dari analisa mikrobiologi yaitu untuk membiakkan bagian tanaman dalam ukuran yang sekecil-kecilnya seperti sel, jaringan dan organ, oleh karena itu, laboratorium analisa mikrobiologi harus selalu mengutamakan dan memperhatikan tingkat sterilitas dari ruangan-ruangannya, sehingga terbebas dari kontaminasi dan mikroorganisme

yang tidak dikehendaki. Ruang-ruang dalam laboratorium analisa mikrobiologi dikelompokkan menurut macam kegiatan yang ada di dalamnya, yaitu:

1. Ruang Tidak Steril

Ruang yang termasuk dalam kategori ini adalah ruang yang tidak diharuskan selalu steril, tetapi harus selalu bersih. Ruang yang termasuk dalam kelompok ini adalah:

- a. *Ruang tamu*; laboratorium analisa mikrobiologi harus dilengkapi dengan ruang tamu, karena tidak menutup kemungkinan laboratorium analisa mikrobiologi didatangi oleh tamu. Ruang tamu ini sebaiknya berada di bagian paling depan dan berhubungan langsung dengan ruang administrasi.
- b. *Ruang administrasi*; dalam laboratorium analisa mikrobiologi ruang administrasi digunakan sebagai tempat untuk mengarsipkan surat tentang pembelian alat-alat laboratorium jika ada yang rusak dan lain sebagainya.
- c. *Ruang staf laboratorium*; analisa mikrobiologi membutuhkan staf peneliti dalam jumlah banyak. Tujuannya agar dapat diadakan pembagian kerja sesuai dengan spesialisasinya masing-masing. Di dalam ruang staf dapat pula dilaksanakan diskusi antar staf pada waktu berkumpul bersama. Disamping itu ruang staf ini dapat berfungsi sebagai tempat istirahat setelah seharian bekerja dengan tekun di dalam ruangan laboratorium.
- d. *Kamar mandi/WC*; laboratorium analisa mikrobiologi harus selalu dalam suasana bersih untuk menghindari kontaminasi oleh mikroorganisme. Bila pekerja akan memasuki ruang inokulasi, tubuh dan pakaian harus bersih, tidak berkeringat, dan tidak berdebu. Untuk inilah maka kamar mandi dan wc perlu disediakan dengan syarat harus selalu dalam keadaan bersih.
- e. *Ruang ganti pakaian*; untuk menghindari terjadinya kontaminasi oleh mikroorganisme, maka karyawan di dalam laboratorium analisa mikrobiologi harus memakai pakaian yang bersih, dalam arti baru dicuci. Oleh karena itu di dalam laboratorium analisa mikrobiologi harus disediakan ruang untuk ganti pakaian.

- f. *Ruang persiapan*; ruang ini dipergunakan untuk mempersiapkan sampel, medium dan alat-alat. Proses sterilisasi alat dan bahan dilaksanakan juga di ruangan ini, sehingga pada ruangan ini juga harus dilengkapi tempat mencuci alat-alat serta alat sterilisasinya. Selain itu ruang persiapan dipergunakan juga untuk menyimpan medium dan alat-alat yang sudah steril. Adapun alat-alat yang lazim ditempatkan pada ruangan ini adalah autoklaf, tabung gas beserta kompornya, lemari es, alat-alat gelas seperti labu takar, gelas ukur, erlemeyer, cawan petri, pipet dan botol-botol kultur.
- g. *Ruang penimbangan*; dalam membuat larutan kita harus terlebih dahulu menimbang bahannya. Alat yang digunakan untuk menimbang sering kita sebut timbangan analitik digunakan dalam ruangan tersendiri yang bentuk dan konsentrasinya dibuat sedemikian rupa sehingga ruangan ini tidak terpengaruh oleh getaran-getaran dan hembusan angin yang dapat mempengaruhi hasil penimbangan. Biasanya ruang penimbangan berhubungan langsung dengan ruang persiapan sehingga peralatan yang ada dalam ruangan ini berupa: timbangan analitik, lemari es dan freezer untuk menyimpan larutan stok, hot plate dengan *magnetic stirrer*, Bunsen dengan kaki tiga, pH meter, lemari bahan kimia dan alat-alat. Hal yang perlu diperhatikan bahwa komponen bahan kimia penyusun medium analisa mikrobiologi sangat banyak macam jenisnya. Oleh karena itu, penyimpanannya memerlukan pengaturan khusus supaya mudah mencarinya. Penyimpanan yang tidak teratur akan memperlambat pekerjaan. Maka diperlukan tempat penyimpanan bahan kimia yang dibuat dari kayu maupun kaca.
- h. *Ruang mikroskop*; ruangan ini dipergunakan untuk pengamatan dan analisa.

2. Ruang Tidak Mutlak Steril

Ruang tidak mutlak steril juga membutuhkan kondisi yang selalu harus bersih dan tidak berdebu, tetapi dinding atau lantainya tidak perlu disterilkan dengan alkohol. Sehingga agar ruangan ini tidak berdebu maka harus diberi alat pendingin (AC). Ruang yang tergolong dalam kelompok ini adalah *ruang inkubasi*; eksplan yang sudah

ditanam dalam medium analisa mikrobiologi perlu dipantau pertumbuhannya setiap hari. Untuk pemantauan ini memerlukan ruangan yang khusus yang keadaannya lebih steril daripada ruangan planlet, yaitu ruangan inkubator. Ruangan inkubator harus memiliki suhu kurang lebih 25°C dan harus dilengkapi dengan lampu-lampu neon, karena eksplan yang ditumbuhkan dalam ruangan inkubasi membutuhkan temperatur dan cahaya diatur dan disesuaikan jenis eksplannya. Untuk menghemat tempat, maka dalam ruang inkubator ini dapat dilengkapi dengan rak-rak dari kayu dengan dinding rapat tetapi alasnya berlubang-lubang supaya aerasi dapat berjalan dengan baik. Setiap kotak pada rak ini dilengkapi dengan *da-light neon lamp 20 watt* yang jaraknya 40-60 cm diatas permukaan tutup botol eksplan.

3. Ruang Mutlak Steril (ruang penanaman/inokulasi)

Satu-satunya ruangan di dalam laboratorium analisa mikrobiologi yang mutlak steril adalah ruangan penanaman (inokulasi). Ruangan ini biasanya sengaja dibuat dengan ukuran yang tidak terlalu besar. Tujuannya adalah agar pelaksanaan sterilisasi ruangnya tidak membutuhkan waktu yang lama dan tidak mengalami kesulitan. Dinding ruangan penanaman (inokulasi) dilengkapi dengan porselin, sehingga sterilisasi mudah dilakukan. Alat yang digunakan untuk melakukan penanaman (Inokulasi) adalah *Laminar Air Flow Cabinet* (LAFC) yang biasanya diletakkan pada salah satu sisi ruangan. Letak barang-barang di dalam ruangan ini harus diatur secara rapi dan teratur agar tidak mengganggu pelaksanaan sterilisasi ruangan. Disebelah kanan LAFC sebaiknya terdapat meja porselin. Meja ini digunakan untuk meletakkan alat-alat yang diperlukan sebelum melakukan penanaman. Alat-alat seperti botol-botol medium, skalpel, pinset, petridish, lampu spritus, tissue, hand sprayer dan lain sebagainya diletakkan di atas meja tersebut dan disemprot dengan alkohol 96% dahulu sebelum masuk ke dalam LAFC. Aerasol sterilisation dapat juga dilakukan dengan menggunakan lampu ultra violet (*UV lamp*). Lampu ini digunakan untuk sterilisasi udara, lampu UV ini harus dinyalakan pada saat ruangan tidak digunakan. Dan harus dimatikan ketika akan melakukan penanaman.

B. Alat-Alat dalam Analisa Mikrobiologi

Dalam pengerjaan analisa mikrobiologi, salah satu hal yang sangat menentukan adalah ketersediaan alat-alat. Alat-alat yang biasa digunakan di dalam laboratorium mikrobiologi (baik laboratorium mikrobiologi pangan, mikrobiologi lingkungan atau mikrobiologi farmasi) beserta penjelasan kegunaannya secara umum yang dikelompokkan berdasarkan fungsinya:

1. Alat transfer, pengukur dan penakar

- a. **Pipet;** merupakan selongsongan tabung yang berfungsi untuk mentransfer cairan. Istilah pipet lebih ditekankan kepada tabung kaca atau plastik tersebut. Jenis-jenis pipet berdasarkan klasifikasi Barker antara lain:

Pipet ukur/*graduated pipette* dan drum pipet; merupakan pipet gelas berskala yang berguna untuk memindahkan cairan ini umumnya dipakai dengan volume 1 ml, 5 ml atau 10 ml. Sebaiknya jangan mentransfer volume sampel $<10\%$ dari volume total pipet, misalnya untuk mentransfer cairan 0,1 ml jangan menggunakan pipet ukur >1 ml (5 ml atau 10 ml). Pipet ukur dilengkapi dengan *cotton wool* yang dimasukkan pada bagian pangkalnya yang berfungsi untuk mencegah kontaminasi saat pemipetan dari alat penghisap dan sebaliknya. Pipet ukur umumnya disterilisasi secara berkelompok dan dimasukkan ke dalam drum pipet dari aluminium. Untuk mencegah kerusakan ujung pipet ukur pada bagian dasar drum pipet dapat dimasukkan gumpalan kapas.

Volumetric pipette; merupakan pipet dengan bagian tengah menggelembung (yang menampung sebagian besar cairan) dan hanya memiliki satu garis skala misalnya 10 ml atau 5 ml (tidak memiliki pembagian skala lebih kecil seperti pipet ukur).

Pipet tetes/*Pasteur Pipette*; merupakan pipet gelas berdiameter 6-7 mm ini berfungsi untuk memindahkan sejumlah kecil cairan dengan menghisapnya memakai gelembung karet elastis yang dapat ditekan. Volume pasti yang disedot tidak dapat diketahui. Salah satu penerapannya adalah untuk menambahkan asam sedikit demi sedikit pada media saat mengatur pH.

Transfer pipette; merupakan pipet yang bentuknya mirip dengan pipet tetes namun terbuat dari plastik. Antara bagian gelembung dan tabung pipetnya menyatu. Umumnya digunakan sekali buang (*disposable*). Salah satu fungsinya adalah menambahkan spesimen kultur cair pada objek glass untuk diamati.

Pipet aids; adalah sekumpulan alat yang fungsinya untuk membantu proses penyedotan dan alat-alat ini dapat dipasang pipet seperti pipet ukur. Istilah pipet aids lebih ditujukan untuk alat yang membantu pipet. Jenis-jenis pipet aids antara lain:

Rubber bulb/pipet filler; adalah alat untuk menyedot larutan yang dapat dipasang pada pangkal pipet ukur. Karet sebagai bahan filler merupakan karet yang resisten bahan kimia. Filler memiliki 3 saluran yang masing-masing saluran memiliki katup. Katup yang bersimbol A (*aspirate*) berguna untuk mengeluarkan udara dari gelembung. S (*suction*) merupakan katup yang jika ditekan maka cairan dari ujung pipet akan tersedot ke atas. Kemudian katup E (*exhaust*) berfungsi untuk mengeluarkan cairan dari pipet ukur.

Pipet-aid; merupakan alat penghisap cairan yang dapat dipasang pipet ukur. Pipet-aid bekerja menggunakan motor elektrik yang dikendalikan melalui dua tombol yaitu tombol hisap dan tombol tiup. Sumber tenaga pipet-aid dapat berupa baterai rechargeable atau kabel yang terkoneksi langsung dengan sumber tegangan.

Pipet pump; penyedotannya dikendalikan melalui thumb wheel. Pangkal pipet ukur dapat dimasukkan kedalam alat ini. Prinsipnya sama dengan penyedotan cairan pada *syringe*. Untuk mengeluarkan cairan maka *plunger*/tombol drain cairan dapat ditekan sehingga cairan keluar dengan cepat.

Pipettors; atau alat pempipet adalah sebutan alat-alat yang berguna untuk menghisap cairan dan mentransfernya. Pipettors tidak memerlukan pipet ukur, tidak seperti pipet-aids. Jenis-jenis pipettors antara lain:

Adjustable volume pipettors; adalah pipettors yang dapat diatur volume cairannya berdasarkan besar kecilnya volume udara yang dihisap. Prinsip penghisapan adalah sama dengan syringe namun dilengkapi dengan pegas yang dapat mengembalikan posisi tombol penghisap ke tempat semula. Beberapa pilihan kisaran volumenya adalah 1-10 ml, 1-5 ml, 10-100 ul, 2-10 ul, dll. Istilah mikropipet lebih menjurus kepada pipettors dengan skala volume yang kecil, umumnya dibawah 100 ul dan mungkin akan menimbulkan ketidaknyamanan jika pipettors dengan kisaran volume 1-10 ml disebut dengan mikropipet. Dalam penggunaannya, pipettors memerlukan tip untuk menampung cairan yang dihisap. Tip ini fungsinya sama seperti pipet ukur namun hanya berguna untuk menampung cairan tanpa adanya skala. Tip disterilisasi dalam tip box.

Fixed volume pipettors; pipettors yang memiliki volume hisap yang tidak dapat diubah atau tetap. Volume yang tersedia diantaranya adalah 5 ml, 1 ml, 100 ul, 10 ul, dll.

Multichannel pipettors; pipettors yang mempunyai banyak ujung sehingga satu alat dapat dipasang beberapa tip untuk mentransfer cairan-cairan ke beberapa wadah sekaligus. Jumlah percabangan yang tersedia adalah 4, 8 atau 12 cabang. Alat ini tidak begitu banyak dipakai dalam mikrobiologi namun lebih sering digunakan pada laboratorium serologi atau bioteknologi.

Automatic pipettors; berupa alat pempipet otomatis yang mampu memindahkan cairan dari wadah satu ke wadah lain tanpa ditekan secara manual. Proses penghisapan dan peniupan dikerjakan menggunakan prinsip peristaltis, maka dari itu alat ini membutuhkan selang. Volume cairan dapat diatur dan alat akan berhenti menyedot setelah volume tersebut selesai dipindahkan. Salah satu penerapannya adalah saat membagi media pada tabung-tabung dengan volume yang sama.

- b. **pH meter dan kertas pH meter universal;** pH meter berguna untuk mengukur/mengetahui pH suatu larutan. Hal ini sangat penting dalam pembuatan media karena pH pada media

berpengaruh terhadap pertumbuhan mikroorganisme. pH meter dapat berbentuk peralatan digital ataupun analog yang dilengkapi probe untuk mendeteksi konsentrasi ion hidrogen atau hidroksida. Terdapat juga cara pengukuran pH yang lebih sederhana yaitu dengan menggunakan kertas yang mengandung bahan indikator pH. Kertas pH indikator dicelupkan sampai tidak ada perubahan warna kemudian strip warna dicocokkan dengan skala warna acuan.

- c. **Timbangan/neraca analitik;** adalah alat untuk mengetahui berat/massa suatu bahan. Di dalam lab mikrobiologi umumnya dipakai untuk menimbang media pertumbuhan, menimbang sampel, dll. Timbangan digital saat ini dilengkapi dengan penara kembali (*tare*), pengubah satuan, ketelitian yang tinggi, dan fitur lainnya. Timbangan analitik standar untuk mikrobiologi harus memiliki ketelitian 0,1 g dengan kapasitas ≥ 2000 g.
- d. **Labu Erlenmeyer;** berfungsi untuk menampung larutan atau cairan. Labu Erlenmeyer dapat digunakan untuk meracik dan menghomogenkan bahan-bahan komposisi media, menampung akuades, membuat pelarut, kultivasi mikroorganisme dalam kultur cair, dll. Terdapat beberapa pilihan berdasarkan volume cairan yang dapat ditampungnya yaitu 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml, dsb. Mulut labu yang kecil tapi dengan bagian bawah yang melebar memberikan keuntungan tersendiri saat bekerja secara aseptis atau ketika mengkultur mikroorganisme yang membutuhkan aerasi.
- e. **Beaker glass;** adalah alat penampung cairan yang dapat digunakan untuk berbagai macam keperluan. Fungsinya hampir sama dengan Erlenmeyer namun perbedaannya adalah beaker glass memiliki mulut bercucuk yang lebar dan diameter mulut sama dengan diameter bagian dasar sehingga sesuai untuk proses pengadukan dengan spatula. Alat ini tidak cocok untuk menampung cairan steril mengingat mulut yang lebar memperbesar resiko kontaminasi dan tumpah.

- f. **Gelas ukur/graduated cylinder**, berguna untuk mengukur volume suatu cairan. Seperti labu erlenmeyer, gelas ukur memiliki beberapa pilihan berdasarkan skala volumenya. Untuk mengurangi resiko pecah tersedia juga gelas ukur plastik. Pada saat mengukur volume larutan, sebaiknya batas air tersebut ditentukan berdasarkan meniskus cekung larutan. Untuk mengukur cairan dengan volume yang kecil (8 ml misalnya) sebaiknya menggunakan pipet atau pipettors tidak dengan gelas ukur berukuran 10 ml. Salah satu cara meningkatkan presisi dan efektifitas pengukuran maka untuk mengukur volume tertentu (20 ml misalnya) dituang dahulu cairan sampai sedikit dibawah batas skala yang diinginkan (18 ml misalnya) kemudian sisanya ditambahkan sedikit demi sedikit menggunakan pipet tetes.

2. Alat penghancur dan homogenisasi

Hot plate stirrer dan Stirrer bar, berfungsi untuk menghomogenkan suatu larutan dengan pengadukan dan panas. Alat ini terdiri dari hot plate stirrer dan batangan magnet yang terpisah. Pelat (plate) yang terdapat dalam alat ini dapat dipanaskan sehingga mampu mempercepat proses homogenisasi. Di dalam pelat juga terdapat suatu magnet yang dapat diatur kecepatannya sehingga magnetic stirrer yang dimasukkan ke dalam wadah berisi larutan akan mengikuti putaran di dalam pelat dan tercipta arus pengadukan otomatis.

Blender, atau mixer dalam mikrobiologi digunakan untuk menghancurkan sampel padatan supaya homogen dan mudah untuk dianalisa. Spesifikasi blender minimal menurut Maturin and Peeler (2001) adalah yang memiliki 4 pisau putar stainless steel tajam dengan putaran 10.000-12.000 rpm dan juga wadah tertutup berukuran 1000 ml. Blender dapat benar-benar membuat suatu larutan menjadi homogen karena terjadi pencacahan bahan berkali-kali dan bahan mengalami kontak langsung dengan pisau. Kelemahan blender adalah dapat menciptakan penyebaran aerosol yang menjadi berbahaya jika sampel diperkirakan mengandung patogen.

Stomacher, berbeda dengan blender, cara stomacher menghancurkan sampel adalah dengan ditekan menggunakan satu lempeng yang dinamakan pedal. Sampel dimasukkan kedalam plastik steril *heavy duty* lalu plastik dihimpit berkali-kali dengan pedal. Kecepatan, jarak himpitan dan lama waktu dapat diatur dan disesuaikan jenis sampel. Kelebihannya adalah alat tidak perlu disterilisasi ulang dan tidak menciptakan aerosol.

Vortex mixers, adalah alat yang memiliki suatuudukan berengsel yang dapat berputar cepat sehingga larutan dalam botol atau tabung yang diletakkan (dengan ditekan) akan berputar dan teraduk. Umumnya digunakan untuk menghomogenisasi larutan dalam botol atau tabung saja. Jika menggunakan alat ini analisis tidak perlu mengocok tabung menggunakan tangan dan cara ini mampu meminimalisasi resiko tumpahan.

Mortar-pestle, mortar (mangkuk) dan pestle (penumbuk) yang terbuat dari porselin digunakan untuk menumbuk atau menghancurkan materi sampel, misal daging, kacang atau tanah sebelum diproses lebih lanjut.

3. Alat untuk keperluan sterilisasi dan aseptis

Otoklaf (*Autoclave*); alat sterilisasi berbagai macam alat dan bahan yang digunakan dalam mikrobiologi menggunakan uap air panas bertekanan. Tekanan yang digunakan pada umumnya 15 Psi atau 1 atm dan dengan suhu 121°C (250°F). Jadi tekanan yang bekerja ke seluruh permukaan benda adalah 15 pon tiap inchi (15 Psi = 15 *pounds per square inch*). Lama sterilisasi adalah 15 menit pada suhu 121°C. Dengan syarat suhu, tekanan dan waktu tersebut maka segala bentuk mikroorganisme dapat dimatikan.

Biological Safety Cabinet (BSC) atau ***Laminar Air Flow Cabinet (LAFC)***; merupakan suatu area kerja yang bebas dari mikroorganisme, artinya udara yang terdapat di daerah tersebut benar-benar steril. Fungsi daerah ini adalah untuk tempat kerja proses transfer atau manipulasi biakan. Area steril ini dapat diciptakan oleh LAFC atau BSC karena alat ini mampu menyaring

partikel udara termasuk sel mikroorganisme sehingga udara yang dihirup masuk ke area kerja menjadi bebas mikroorganisme. Alat ini memiliki suatu pompa untuk menghirup udara dan melewatkannya pada saringan berukuran pori-pori sangat kecil. Penggunaan LAFC atau BSC dalam kerja aseptis akan sangat menekan resiko kontaminasi dari udara sekitar kepada biakan dan juga menjaga atau membuat aman operator dari terpaparnya kepada biakan bakteri berbahaya.

Oven; berfungsi sebagai alat sterilisasi dengan prinsip panas kering. Umumnya alat-alat yang disterilasi dengan oven adalah alat gelas seperti cawan atau pipet ukur. Sterilisasi dapat dilakukan pada suhu 60-180°C selama 1/2 sampai 3 jam.

Filter apparatus dan kertas membran filter; alat ini digunakan untuk proses sterilisasi secara mekanis (dengan penyaringan). Prinsipnya yaitu menyaring suatu cairan non steril dengan kertas membran sehingga cairan yang melewatinya akan terbebas mikroorganisme (steril). Pada umumnya bahan yang disterilkan melalui cara ini adalah bahan yang mengandung senyawa tidak tahan suhu tinggi atau tekanan tinggi seperti serum darah, antibiotik, glukosa dll. Filter apparatus umumnya terdiri dari corong, filter base, penjepit corong, labu pengumpul, selang, dan pompa vakum. Filter apparatus juga dapat digunakan untuk menghitung mikroorganisme dengan prinsip yang sama dengan sterilisasi filtrasi. Kertas membran filter memiliki pori-pori yang sangat kecil, lebih kecil dari ukuran bakteri pada umumnya.

Diameter pori-pori dapat berukuran 0,2 μm , 0,45 μm , 0,65 μm dll. Kertas membran yang baik adalah yang bebas dari bahan inhibitor atau stimulus pertumbuhan, bebas dari bahan yang mampu menginterferensi indikator media, tinta skala yang tidak beracun, berdiameter 47 mm, berpori maksimal 0,45 μm , minimal 70 % luas area berpori. Mampu dilewati dengan *flowrate* 55 ml/menit/cm² pada 25 C, diharapkan tetap mampu menyaring kultur cair 1x10³ *Serratiamarcescens*.

Bunsen burner, loop incinerator dan pembakar spirtus; bunsen burner dan pembakar spirtus digunakan untuk sterilisasi alat inokulasi dengan pembakaran seperti sterilisasi jarum inokulum atau spreader. Untuk memastikan kesterilannya jarum inokulum dibakar sampai membara dan spreader dapat dicelupkan alkohol lalu dibakar. Bunsen burner berbahan bakar gas yang disalurkan melalui pipa sedangkan pembakar spirtus berbahan bakar spirtus (methanol). Namun pembakar spirtus lebih mudah ditemukan di banyak laboratorium karena efisien dan portable. Tersedia juga alat *loop incinerator*/electric bunsen burner/*electric incinerator* untuk membakar jarum inokulum. Ujung jarum inokulum dapat dimasukkan ke dalam tabung keramik panas selama 6 detik untuk mensterilisasinya. Pembakar spirtus dapat menciptakan sirkulasi udara dari bawah ke atas melewati api karena proses pembakaran. Seringkali hal ini dianggap mampu menciptakan lingkungan udara yang aseptis disekitar pembakar spirtus, tetapi jika memang load kontaminasi besar dan banyak gangguan aliran udara maka hal ini juga tidak sepenuhnya benar. Oleh karena itu sebaiknya tetap menggunakan LAFC jika menginginkan kerja pada udara yang steril.

Gas torch; atau pembakar api portabel berbahan bakar gas sangat berguna saat dilakukan pengambilan sampel diluar laboratorium. Fungsinya adalah untuk mensterilisasi sampel point yang dapat berupa kran, pipa atau yang lainnya sebelum pengambilan sampel dilakukan. Selain itu dapat digunakan untuk sterilisasi dengan api pada berbagai alat karena gas torch lebih nyaman digenggam dibandingkan pembakar bunsen atau pembakar spirtus.

Sprayer; berupa alat penyemprot sederhana ini dapat sangat membantu dalam proses sterilisasi menggunakan alkohol. Alkohol yang disebarkan dalam aerosol kecil-kecil akan meningkatkan efisiensi kontak dengan mikroorganisme pengontaminasi. Umumnya digunakan alkohol (ethanol) 70% bukan 95% karena akan tidak mudah menguap tapi masih dalam konsentrasi yang mematikan bagi mikroorganisme, selain itu alkohol sangat pekat mampu merusak kulit.

4. Alat inokulasi dan kultivasi Mikroorganisme

Cawan Petri; cawan petri terbuat dari gelas dan berfungsi sebagai tempat pembiakan mikroorganisme. Media pertumbuhan dapat dituang ke cawan bagian bawah dan cawan bagian atas sebagai penutup. Cawan petri tersedia dalam berbagai macam ukuran yaitu berdiameter 5 cm, 8 cm, 9 cm atau 15 cm. Cawan berdiameter 15 cm dapat menampung media sebanyak 15-20 ml, sedangkan cawan berdiameter 9 cm kira-kira cukup diisi media sebanyak 10 ml. Banyak juga tersedia cawan petri disposable yang terbuat dari plastik, kelebihanannya tidak beresiko pecah dan aman untuk ditumpuk cukup tinggi. Terdapat dua jenis cawan petri yaitu cawan tidak berventilasi (yang umum dipakai) dan berventilasi. Cawan berventilasi digunakan untuk pembiakan anaerob. Untuk standardisasi digunakan cawan berukuran 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm, dipilih cawan yang bebas gelembung dan goresan sehingga distribusi agar dapat merata.

Tabung reaksi; tabung reaksi digunakan sebagai tempat media pertumbuhan atau penampungan cairan lainnya seperti pelarut dalam pengenceran. Tabung reaksi dipilih karena bentuknya yang vertikal (bandingkan dengan cawan petri) sehingga mempermudah penanganan dan menghemat tempat penyimpanan. Tabung reaksi dapat diisi media padat maupun cair. Media padat yang dimasukkan ke tabung reaksi dapat diatur menjadi 2 bentuk menurut fungsinya, yaitu media agar tegak (*deep tube agar*) dan agar miring (*slants agar*). Untuk membuat agar miring, perlu diperhatikan tentang kemiringan media yaitu luas permukaan yang kontak dengan udara tidak terlalu sempit atau tidak terlalu lebar dan hindari jarak media yang terlalu dekat dengan mulut tabung karena memperbesar resiko kontaminasi. Tutup tabung reaksi dapat berupa kapas, tutup metal, tutup plastik atau aluminium foil. Tutup tabung yang paling baik dan aman digunakan adalah tutup plastic polypropylene berulir karena akan mencegah timbulnya aerosol. Ukuran yang umum digunakan adalah 127 x 12,5 mm (menampung 4 ml), 152 x 16 mm (menampung 5-10 ml), 152 x 19 mm (menampung 10-15 ml), 178 x 25 mm (menampung 20 ml).

Botol; botol pipih ataupun bulat di dalam mikrobiologi dapat digunakan sebagai wadah pengambilan sampel atau penyimpanan media pertumbuhan. Ukuran botol yang cocok digunakan adalah 60 ml (untuk menampung 50 ml cairan), 110 ml (menampung 50-100 ml cairan) atau 560 ml (menampung 250-500 ml cairan). Botol sebaiknya harus berpenutup ulir (lebih dari satu putaran) dan terbuat dari *borosilicate glass*. Alternatif lainnya botol dapat terbuat dari plastik tahan sterilisasi yang dapat menekan resiko pecah. Untuk menguji kebocoran botol saat ditutup sempurna maka botol berisi air dibiarkan terbalik beberapa hari.

Spreader/hockey-stick-shape-glass-rod/glass

spreader/Drigalsky spatulas; berfungsi untuk meratakan dan menyebarkan air dari pengenceran (0,1 ml) di atas permukaan agar. Spreader yang terbuat dari kaca (berdiameter 3-4 mm) memiliki beberapa bentuk seperti berbentuk L atau berujung segitiga. Batang L dapat dibuat sendiri dengan memanasi batang gelas lurus yang kemudian ditekuk menjadi batang L (jarak tekukan 36 mm dari ujung bawah). Sudut lekukan yang besar pada drigalsky spatulas (berujung segitiga tumpul) dapat mempengaruhi fungsinya secara tidak langsung. Semakin besar lekukannya maka akan sulit menjangkau atau meratakan air sampai di sudut tepian cawan petri.

Glass beads; adalah manik-manik atau bola gelas kecil (umumnya berdiameter 3 mm) yang digunakan untuk meratakan suspensi biakan dengan menyebarkan beberapa butir di atas permukaan agar dan digoyang merata. *Glass beads* digunakan pada teknik *spread plate* yang fungsinya sama dengan batang L atau *Spreader*. Selain itu *glass beads* dapat juga digunakan untuk melepaskan sel-sel mikroorganisme dari kepala swab saat *glassbeads* digoncangkan pada botol sampel berisi batang swab.

Pemutar cawan petri (Petri dish turntable); alat ini dapat membantu saat penanaman mikroorganisme menggunakan teknik spread plate. Cara penggunaannya yaitu cawan petri diletakkan diatas lempengan putar, kemudian sampel yang diberikan ke permukaan agar dapat disebarkan dengan

menekan spreader sambil memutar alat ini. Sterilisasi pemutar cawan petri umumnya dilakukan dengan alkohol.

Tabung durham; tabung durham berbentuk mirip dengan tabung reaksi namun ukurannya lebih kecil dan tanpa tutup. Tabung durham berfungsi untuk menampung/menjebak gas yang terbentuk dari metabolisme pada bakteri yang diujikan. Penempatannya terbalik dalam tabung reaksi dan harus terendam sempurna dalam media (jangan sampai ada sisa udara) sebelum diinokulasikan bakteri uji.

Media dispenser (glass repeating dispenser); alat yang dapat dipasang pada mulut erlenmeyer ini digunakan untuk membagi/menuang media agar ke dalam cawan petri dengan volume yang sama setiap cawan. Sebelum dituang media ditampung dahulu pada wadah di media dispenser selanjutnya sejumlah volume media tersebut dituangkan ke cawan petri. Penuangan media padat bisa juga dilakukan tanpa media dispenser tetapi lebih beresiko meningkatkan variasi ketebalan agar setiap cawan. Media agar yang tipis dapat mempengaruhi teknik inokulasi streak.

Jarum inokulum/ose (inoculating loops); berfungsi untuk memindahkan biakan untuk ditanam/ditumbuhkan ke media baru. Jarum inokulum biasanya terbuat dari kawat nichrome atau platinum sehingga dapat berpijar jika terkena panas. Bentuk ujung jarum dapat berbentuk lingkaran (*loop*) dan disebut ose atau *inoculating loop*/transfer loop, dan yang berbentuk lurus disebut *inoculating needle*/transfer needle. *Inoculating loop* cocok untuk melakukan streak di permukaan agar, sedangkan *inoculating needle* digunakan untuk inokulasi secara tusukan pada agar tegak (*stab inoculating*). Terdapat juga jarum inokulum berbentuk L yang sangat bermanfaat saat membelah agar untuk preparasi *Heinrich's Slide Culture*.

Pinset, gunting, pisau, spatula dan scalpel; berbagai alat-alat ini sering sangat bermanfaat dalam laboratorium mikrobiologi terutama pada saat preparasi sampel atau penanaman. Sebaiknya alat-alat tersebut terbuat dari stainless steel.

5. Alat untuk penjagaan suhu dan penyimpan

Inkubator (*Incubator*); adalah alat untuk menginkubasi atau memeram mikroorganisme pada suhu yang terkontrol (umumnya diatas suhu ambient). Alat ini dilengkapi dengan pengatur suhu, dan pengatur waktu. Semakin kecil ukuran inkubator maka semakin rentan pula perubahan suhunya saat pintu inkubator dibuka. Perlu dipertimbangkan pula keseragaman suhu yang ada didalam dengan memperhatikan pola penempatan elemen pemanas atau terdapatnya kipas penyebar suhu. Pintu kaca yang terdapat pada beberapa model dibiarkan tertutup saat melihat biakan secara sekilas supaya tidak terjadi penurunan suhu. Tipe lain inkubator berdasarkan kegunaannya secara khusus adalah

- ***Shaker incubator*,** inkubator yang dilengkapi dengan pengocok untuk aerasi biakan.
- ***Cooled incubator*,** inkubator untuk suhu inkubasi dibawah suhu ambient.
- ***CO₂ incubator*,** inkubator yang mampu menyediakan keadaan kaya karbondioksida.
- ***Automatic temperature change incubator*,** inkubator yang dilengkapi dengan pengatur perubahan suhu otomatis sehingga tidak perlu memindahkan kultur ke inkubator lain saat membutuhkan perubahan suhu secara bertahap.
- ***Portable incubator*,** inkubator jinjing atau mudah dibawa yang umumnya diaplikasikan untuk mikrobiologi lingkungan.
- ***Incubator room*,** suatu ruangan yang diubah menjadi inkubator sesuai dengan keperluan dan syarat mikrobiologisnya.

***Waterbath*;** fungsi *waterbath* cukup beragam dalam lab mikrobiologi, salah satunya adalah untuk inkubasi dalam waktu singkat seperti perlakuan suhu panas (*heat shock*), reaksi aglutinasi, *thawing* sampel beku secara cepat (suhu 45°C tidak lebih dari 15 menit), menjaga media agar tetap cair sebelum dituang, dll. Keunggulan *waterbath* dibandingkan dengan inkubator adalah *waterbath* lebih cepat mencapai temperatur yang diinginkan dan

tidak cepat kehilangan panas karena mempergunakan air dalam distribusi suhu. Selain elemen pemanas beberapa tipe juga dilengkapi dengan pencipta arus untuk menjaga suhu tetap seragam. Lebih baik menggunakan akuades untuk mencegah kerak yang ditimbulkan saat mempergunakan suhu panas. Tutup waterbath dapat mencegah evaporasi yang berlebihan ketika tercapai suhu tinggi, selain itu dapat juga memanfaatkan suatu benda untuk menutupi permukaan air yang panas misalnya bola-bola pingpong mampu mengurangi evaporasi dengan memperkecil luas permukaan air yang kontak dengan udara.

Refrigerator, digunakan untuk menyimpan benda yang membutuhkan suhu dingin dalam penyimpanannya ($2-8^{\circ}\text{C}$). Aplikasi dalam mikrobiologi diantaranya adalah untuk menyimpan sampel sementara, thawing sampel beku (sampel beku dicairkan secara bertahap pada suhu $2-8^{\circ}\text{C}$ selama 18 jam, menyimpan media pertumbuhan, menyimpan kultur, menyimpan larutan, dll. fungsi utama refrigerator adalah menghambat atau memperlambat pertumbuhan mikroorganisme sehingga bahan memiliki daya simpan yang lebih lama.

Freezer, umumnya memiliki suhu 0 sampai -20°C . Suhu beku berfungsi untuk menyimpan bahan yang akan rusak jika dibiarkan dalam keadaan tidak beku, seperti reagen, enzim, faktor pertumbuhan atau larutan tertentu. Sampel yang akan dianalisa jangan disimpan dalam freezer karena tidak semua mikroorganisme dapat bertahan dalam temperatur beku.

Sample container, setelah pengambilan sampel dilakukan maka diperlukan suatu wadah penyimpanan botol sampel yang dapat menjaga jumlah dan jenis mikroorganisme saat transportasi sampel oleh karena itu *sample container* atau *ice box* diperlukan. *Sample container* umumnya dirancang untuk menjaga suhu dingin maka dari itu terdapat sekat/isolator suhu. Suhu dingin dibuat dengan memasukkan es ke dalam sample container.

Rak tabung reaksi, berguna untuk meletakkan atau menyimpan tabung reaksi sehingga mudah diorganisir. Rak tabung reaksi

sebaiknya terbuat dari polypropylene sehingga dapat diautoklaf dan mengurangi resiko pecah. Lebih baik hindari rak tabung reaksi yang terbuat dari kayu karena dikhawatirkan dalam keadaan lembab kayu akan ditumbuhi jamur.

Desikator; di dalam lab mikrobiologi desikator biasanya digunakan untuk menjaga suatu bahan tetap kering seperti menyimpan media pertumbuhan yang sangat higroskopis atau reagen tertentu. Uap air yang berada dalam kontainer desikator akan diserap oleh desiccant yang akan berubah warnanya (dari biru menjadi pink) jika telah jenuh dengan air.

6. Alat observasi dan penghitung

Mikroskop cahaya; mikroskop adalah alat berlensa yang digunakan untuk melihat objek kecil yang sukar dibedakan jika dilihat dengan mata telanjang. Mikroskop memiliki banyak jenis dan fungsinya, tetapi jenis mikroskop yang paling umum digunakan adalah mikroskop cahaya. Pada umumnya mata tidak mampu membedakan benda dengan diameter lebih kecil dari 0,1 mm maka jika ingin melihat morfologi sel mikroorganisme diperlukan bantuan mikroskop. Mikroskop cahaya umumnya memiliki perbesaran dari 40x sampai 1000x sehingga sesuai untuk melihat morfologi sel mikroorganisme.

Mikroskop stereo; mikroskop ini berfungsi untuk melihat objek yang membutuhkan perbesaran tidak terlalu besar. Di laboratorium mikrobiologi, mikroskop stereo biasanya digunakan untuk menghitung atau mengamati secara detail bentuk koloni bakteri atau jamur yang tumbuh pada cawan petri. Perbesaran maksimal yang mampu dilihat adalah 40x.

Object glass/glass slide dan Cover glass; ulasan spesimen padat atau cair yang akan dilihat dengan mikroskop ditempatkan ke permukaan object glass kemudian dilapisi (ditutup) dengan cover glass supaya melindungi lensa mikroskop dari spesimen. Object glass umumnya dijual dalam box berisi 100 slides dan sebaiknya sekali pakai langsung dibuang tidak dicuci lagi. Cover

glass umumnya memiliki luas 16 mm² dengan ketebalan Grade No.1. Coverglass yang terbuat dari plastik juga tersedia di pasaran.

UV Cabinet; pada suatu uji mikrobiologi tertentu yang menghasilkan suatu zat yang hanya berpendar jika dikenai sinar UV pada koloni atau disekitar koloni suatu bakteri tidak dapat dilihat dengan mata telanjang oleh karena itu dibutuhkan UV cabinet untuk melihat perpendaran tersebut.

Colony counter; alat ini berguna untuk mempermudah perhitungan koloni yang tumbuh setelah diinkubasi di dalam cawan karena adanya kaca pembesar. Selain itu alat tersebut dilengkapi dengan skala/kuadran dan latar belakang bercahaya yang sangat berguna untuk pengamatan pertumbuhan koloni sangat banyak. Jumlah koloni pada cawan petri dapat ditandai dan dihitung otomatis yang dapat di-reset. Selain itu terdapat colony counter berbentuk seperti pulpen dengan ujung pulpen dilengkapi dengan sensor sehingga penekanan terhadap perhitungan koloni selain menandai koloni dengan tinta sekaligus juga menghitung otomatis setiap penekanan pada cawan.

7. Alat-alat Pelengkap

Disc dispenser; adalah alat untuk meletakkan kertas cakram (*paper disc*) berisi antibiotik ke permukaan media agar pada metode *disc diffusion*. Jika peletakan paper disc pada media dapat diletakkan satu persatu menggunakan pipet maka alat ini mempermudah pekerjaan tersebut dengan menyebarkan beberapa paper disc dalam sekali tekan pada satu cawan petri.

Freeze-drying; alat ini dipakai untuk mempreservasi/ mengawetkan kultur mikroorganisme. Prinsip yang digunakan untuk mengawetkan sel adalah dengan membekukan dan mengeringkan dengan penguapan dibawah keadaan vakum yang dinamakan liofilisasi (*lyophilization*).

Anaerobic jars; adalah suatu wadah berpenutup kedap udara yang digunakan untuk kultivasi mikroorganisme anaerob. Anaerobic

jars dapat terbuat dari metal atau polikarbonat transparan dan pada beberapa tipe dilengkapi dengan pengukur tekanan. Pemeraman mikroorganisme anaerob dilakukan dengan meletakkan cawan petri di dalam anaerobic jars dan ditambah dengan katalisator pembentuk keadaan anaerobik. Cawan dalam alat ini diletakkan dalam keadaan tidak dibalik karena terkadang tekanan yang turun karena keadaan anaerob dapat menumpahkan media agar ke tutup cawan.

Centrifuge; centrifuge dalam mikrobiologi digunakan untuk mengendapkan atau memekatkan sel mikroorganisme sehingga dapat dipisahkan antara medium (supernatan) dan selnya yang mengendap (natan). Centrifuge modern umumnya dapat mencapai daya sentrifugasi 3000 g yang merupakan kekuatan yang cukup untuk mendepositkan bakteri dalam waktu yang tidak terlalu lama. Untuk keperluan mikrobiologis seperti fungsi diatas, dapat digunakan centrifuge dengan kecepatan maksimum 4000 rpm yang dapat menampung 15-50 ml kultur. Sebaiknya dipilih tabung centrifuge yang memiliki tutup berulir. Centrifuge dengan *swing-out head* (tabung centrifuge yang dapat berayun) lebih aman dibandingkan dengan *angle head* (dudukan tabung miring) karena menekan terbentuknya aerosol jika menggunakan tabung yang tidak bertutup.

Spektrofotometer; kekeruhan suatu kultur mikroorganisme dapat diukur menggunakan alat ini. Pengukuran kekeruhan (*optical density*) digunakan untuk menggambarkan jumlah bakteri pada suatu kultur cair. Spektrofotometer dapat membaca kekeruhan kultur dengan melewati suatu berkas cahaya kemudian persentase cahaya yang melewatinya dihitung. Semakin keruh berarti cahaya yang diterima semakin sedikit. Aplikasi dalam mikrobiologi diantaranya untuk menghitung *optical density* pada saat membuat grafik pertumbuhan suatu bakteri.

C. Keselamatan Kerja dalam Analisa Mikrobiologi

Laboratorium termasuk tempat kerja yang berpotensi menyebabkan kecelakaan seperti kebakaran, ledakan, keracunan dan iritasi karena laboratorium berisi berbagai alat dan bahan kimia yang sangat potensial menimbulkan bahaya tersebut. Hampir semua kecelakaan mempunyai penyebab, apabila penyebab dapat diketahui atau diperkirakan, maka kecelakaan dapat dicegah/dikurangi.

Keselamatan semua pihak dalam pengerjaan analisa mikrobiologi merupakan tanggung jawab semua pengguna laboratorium. Setiap individu memiliki kewajiban untuk menciptakan lingkungan kerja yang aman, sesuai dengan kemampuan terbaik mereka. Salah satu metoda yang disarankan untuk menciptakan lingkungan kerja yang aman adalah dengan menggunakan petunjuk keselamatan kerja di dalam setiap aktivitas kerja di laboratorium. Petunjuk kerja ini akan membantu mengidentifikasi bahaya yang potensial terjadi di laboratorium, serta menyediakan persyaratan keamanan untuk bekerja di laboratorium.

Pelaksanaan kesehatan dan keselamatan kerja adalah salah satu bentuk upaya untuk menciptakan tempat kerja yang aman, sehat dan bebas dari pencemaran lingkungan sehingga dapat mengurangi dan mencegah terjadinya kecelakaan kerja dan penyakit akibat kerja yang akhirnya dapat meningkatkan efisiensi dan produktivitas kerja.

Pedoman Keamanan Biologi (*Biosafety*) dibuat untuk menginformasikan cara kerja yang spesifik dalam penanganan mikroorganisme patogen di laboratorium dan juga mempersiapkan petunjuk praktis bagi pembuat kode praktek kerja yang dibutuhkan di setiap laboratorium. Petunjuk kerja ini juga menekankan pada pentingnya tanggung jawab individu terhadap keamanan dari setiap aktivitas kerja yang dilakukannya. Tersedianya staf laboratorium yang terlatih dengan baik dan memiliki kualitas teknik keselamatan kerja yang baik serta memiliki tanggung jawab untuk keselamatan pribadi maupun rekan kerja, komunitas dan lingkungan akan menghasilkan lingkungan kerja laboratorium yang aman dan sehat. Setiap individu juga mempunyai tanggung jawab untuk melakukan penilaian resiko

terlebih dahulu sebelum melaksanakan aktifitas yang melibatkan patogen baru atau protokol baru.

Dalam pedoman kerja ini tersedia prosedur penanganan praktek keamanan biologi terutama bagi pekerjaan yang melibatkan bahan biologi beracun serta bahan yang mudah menular dan prosedur yang harus dilakukan untuk bekerja di dalam laboratorium keamanan Biologi (*Biosafety*) tingkat 1, 2, 3 dan 4. Informasi mengenai pelatihan staf juga disertakan bersama penjelasan rinci tentang praktek kerja, peralatan pengamanan dan desain fasilitas laboratorium. Peneliti utama atau penyelia bertanggung jawab terhadap kondisi laboratorium yang aman, serta mengidentifikasi resiko atau bahaya yang berhubungan dengan riset dan aplikasi prosedur keamanan yang dijalankan.

Pelaksanaan kesehatan dan keselamatan kerja adalah salah satu bentuk upaya untuk menciptakan tempat kerja yang aman, sehat dan bebas dari pencemaran lingkungan sehingga dapat mengurangi dan mencegah terjadinya kecelakaan kerja dan penyakit akibat kerja yang pada akhirnya dapat meningkatkan efisiensi dan produktivitas kerja. Kecelakaan kerja tidak saja menimbulkan korban jiwa maupun kerugian materi bagi pekerja dan pengusaha, tetapi juga dapat mengganggu proses produksi secara menyeluruh dan dapat merusak lingkungan yang pada akhirnya akan berdampak pada masyarakat luas. Sifat dari para pekerja laboratorium yang suka meremehkan bahaya, lalai, bekerja dengan tergesa-gesa, malas memakai alat pelindung diri atau tidak dapat memprediksi akan adanya bahaya merupakan penyebab utama kecelakaan kerja.

Dalam penjelasan undang-undang nomor 23 tahun 1992 tentang kesehatan telah mengamanatkan antara lain, setiap tempat kerja harus melaksanakan upaya kesehatan kerja, agar tidak terjadi gangguan kesehatan pada pekerja, keluarga, masyarakat dan lingkungan disekitarnya. Selain itu, telah dijelaskan dalam pasal 86 UU No.13 tahun 2003, dinyatakan bahwa setiap pekerja atau buruh mempunyai hak untuk memperoleh perlindungan atas keselamatan dan kesehatan kerja, moral dan kesusilaan dan perlakuan yang sesuai dengan harkat dan martabat serta nilai-nilai agama.

Keselamatan dan kesehatan kerja difilosofikan sebagai suatu pemikiran dan upaya untuk menjamin keutuhan dan kesempurnaan baik jasmani maupun rohani tenaga kerja pada khususnya dan manusia

pada umumnya, hasil karya dan budayanya menuju masyarakat makmur dan sejahtera. Sedangkan pengertian secara keilmuan adalah suatu ilmu pengetahuan dan penerapannya dalam usaha mencegah kemungkinan terjadinya kecelakaan dan penyakit akibat kerja. Oleh sebab itu perlu adanya tujuan-tujuan tertentu sebagai dasar penerapan kesehatan dan keselamatan kerja antara lain:

- Memelihara dan meningkatkan derajat kesehatan masyarakat pekerja di semua lapangan pekerjaan ke tingkat yang setinggi-tingginya, baik fisik, mental maupun kesehatan sosial.
- Mencegah timbulnya gangguan kesehatan masyarakat pekerja yang diakibatkan oleh tindakan/kondisi lingkungan kerjanya.
- Memberikan perlindungan bagi pekerja dalam pekerjaannya dari kemungkinan bahaya yang disebabkan oleh faktor-faktor yang membahayakan kesehatan.
- Menempatkan dan memelihara pekerja di suatu lingkungan pekerjaan yang sesuai dengan kemampuan fisik dan psikis pekerjaanya.

Keamanan laboratorium juga merupakan hal yang penting, sebagai upaya keselamatan dalam melaksanakan pemeriksaan di laboratorium, dengan tujuan melindungi pekerja dan orang sekitarnya dari resiko terkena gangguan kesehatan yang ditimbulkan laboratorium. Dalam menciptakan keamanan kerja di dalam laboratorium maka diperlukan:

1. Perencanaan percobaan yang akan dilakukan sebelum memulai praktikum.
2. Penggunaan peralatan kerja seperti kaca mata pengaman untuk melindungi mata, jas laboratorium untuk melindungi pakaian dan sepatu tertutup untuk melindungi kaki.
3. Dilarang memakai sandal atau sepatu terbuka atau sepatu berhak tinggi.
4. Wanita/pria yang berambut panjang harus diikat.
5. Dilarang makan, minum dan merokok di laboratorium.
6. Jagalah kebersihan meja praktikum, apabila meja praktikum basah segera keringkan dengan lap basah.
7. Hindari kontak langsung dengan bahan kimia.
8. Hindari mengisap langsung uap bahan kimia.

9. Bila kulit terkena bahan kimia, janganlah digaruk agar tidak tersebar.
10. Pastikan kran gas tidak bocor apabila hendak menggunakan bunsen.
11. Pastikan kran air dan gas selalu dalam keadaan tertutup pada sebelum dan sesudah praktikum selesai.

Laboratorium mikrobiologi adalah laboratorium yang kegiatannya berhubungan dengan mikroorganisme. Khususnya mikroorganisme penyebab infeksi. Oleh sebab itu dalam melaksanakan pekerjaan laboratorium perlu diperhatikan beberapa hal, yaitu:

1. Melindungi petugas/Praktikan
 - Hindari penyebaran percikan bahan infeksi dari spesimen (mis: saat penanaman /pembakaran dengan sengkelit
 - Tempatkan spesimen pada wadah yang tahan bocor
 - Dekontaminasi permukaan meja dengan dekontaminan yang sesuai
 - Cuci tangan pada saat yang tepat dengan sabun/desinfektan, jangan menyentuh mulut, hidung dan mata saat bekerja
 - Jangan makan/minum/merokok saat bekerja
 - Gunakan jas praktikum saat bekerja
 - Hindari luka/tertusuk pada saat bekerja (lakukan segala sesuatu dengan hati-hati)
2. Melakukan sterilisasi yang cukup sebelum mencuci alat/membuang sisa spesimen
3. Menyediakan tempat tersendiri untuk peralatan yang digunakan dan telah terkontaminasi dengan bakteri
4. Menyediakan tempat untuk sampah terkontaminasi dan tidak terkontaminasi
5. Gunakan sarung tangan dengan tepat

Dalam penggunaan alat-alat di laboratoriumpun juga perlu memperhatikan beberapa hal yaitu:

1. Cara menggunakan pipet dan alat bantu pipet
 - Hindari memipet dengan mulut, gunakan alat bantu, masukkan sumbat kapas untuk mengurangi kontaminasi.

- Jangan mencampur bahan infeksi dengan menghisap/meniup pipet.
- Jangan mengeluarkan cairan dari dalam pipet secara paksa.
- Gunakan kapas yang telah diberi desinfektan bila ada tetesan spesimen yang jatuh di meja, kemudian kapas di buang di tempat khusus untuk diautoclave.
- Rendam pipet habis pakai di desinfektan 18-24 jam.

2. Cara pembukaan wadah

Pembukaan wadah botol atau cawan petri dan tabung biakan, memiliki potensi terinfeksi, karena tak terlihat dapat menimbulkan aerosol atau kontaminasi pada kulit atau daerah kerja. Pembukaan wadah di tempat kerja sering dilakukan, bila tidak hati-hati, bahan terinfeksi yang ada dalam wadah dapat menularkan secara langsung atau jatuh ke tempat kerja. Beberapa pencegahan yang dapat dilakukan untuk menghindari resiko terinfeksi adalah sebagai berikut :

- Buka tutup wadah di tempat kerja dengan hati-hati agar isi dalam wadah tidak terpecah ke luar.
- Gunakan jas lab. dan sarung tangan.
- Hindari aerosol.
- Spesimen yang bocor atau pecah hanya dibuka di dalam *Safety Cabinet*.

3. Penerimaan spesimen di laboratorium

- Laboratorium mempunyai loket khusus penerimaan spesimen. Jika jumlah spesimen tidak banyak, maka tempat pemeriksaan spesimen dapat dilakukan pada meja khusus dalam areal laboratorium.
- Spesimen harus di tempatkan dalam wadah yang tertutup rapat untuk mencegah tumpahnya/bocornya spesimen.
- Wadah harus dapat didesinfeksi atau diautoklaf.
- Wadah terbuat dari bahan tidak mudah pecah/bocor.
- Wadah diberi label tentang identitas spesimen.
- Wadah diletakkan pada baki khusus yang terbuat dari logam atau plastik yang dapat didesinfeksi atau diautoklaf ulang.
- Baki harus didesinfeksi / diautoklaf secara teratur setiap hari.
- Jika mungkin, wadah diletakkan di atas baki dalam posisi berdiri.

4. Petugas pembawa spesimen dalam laboratorium
 - Mengenakan jas laboratorium yang tertutup rapat pada bagian depan saat membawa spesimen.
 - Membawa spesimen di atas baki.
 - Mencuci tangan dengan disinfektan jika terkena tumpahan/percikan dari spesimen.
 - Jika spesimen bocor/tumpah di atas baki, dekontaminasi baki dan sisa spesimen diautoklaf.
 - Lapor pada petugas/panitia keamanan kerja laboratorium jika terluka saat bekerja.

5. Tindakan khusus terhadap darah dan cairan tubuh

Tindakan di bawah ini dibuat untuk melindungi petugas laboratorium terhadap infeksi yang ditularkan melalui darah seperti Virus hepatitis B, HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) dan lain-lain.

- a. Mengambil, melabel dan membawa spesimen
 - Gunakan sarung tangan
 - Hanya petugas lab yang boleh melakukan pengambilan darah.
 - 1) Setelah pengambilan darah, lepaskan jarum dari sempritnya dengan alat khusus yang sekaligus merupakan wadah penyimpanan jarum habis pakai. Pindahkan darah ke dalam tabung spesimen dengan hati-hati dan tutup rapat mulut tabung spesimen. Jarum suntik habis pakai sebaiknya dibakar dalam alat insinerasi. Jika fasilitas insinerasi tidak tersedia, jarum suntik dan sempritnya diautoklaf dalam kantong yang terpisah.
 - 2) Tabung spesimen dan formulir permintaan harus diberi label BAHAYA INFEKSI.
 - 3) Masukkan tabung ke dalam kantong plastik untuk dibawa ke laboratorium. Formulir permintaan dibawa secara terpisah.
- b. Membuka tabung spesimen dan mengambil sampel
 - Buka tabung spesimen dalam kabinet keamanan biologis Kelas I dan Kelas II.
 - Gunakan sarung tangan

- Untuk mencegah percikan, buka sumbat tabung setelah dibungkus kain kasa.
- c. Kaca dan benda tajam
 - Jika mungkin, gunakan alat yang terbuat dari plastik sebagai pengganti kaca/gelas. Bahan kaca/gelas dapat dipakai jika terbuat dari borosilikat.
 - Sedapat mungkin, hindari penggunaan alat suntik selain untuk mengambil darah.
- d. Sediaan darah pada kaca objek
 - Pegang kaca objek dengan forsep
- e. Peralatan otomatis
 - Sebaiknya gunakan alat yang tertutup (*enclosed type*)
 - Cairan yang keluar dari alat/effalut harus dikumpulkan dalam tabung/wadah tertutup atau dibuang ke dalam sistem pembuangan limbah.
 - Jika memungkinkan, alirkan hipoklorit atau glutaraldehid ke dalam alat desinfektan hanya pada keadaan tertentu.
- f. Melakukan sentrifus
 - Gunakan tabung sentrifus yang mempunyai tutup
 - Gunakan selongsong/rotor yang dilengkapi penutup
- g. Jaringan
 - Fiksasi jaringan dengan formalin. Spesimen berukuran kecil, seperti dari biopsi jarum, dapat difiksasi dan didekontaminasi dalam waktu kurang lebih 2 jam, tetapi spesimen berukuran besar membutuhkan waktu beberapa hari.
 - Setelah melakukan potong beku (*frozensection*), alat (*cryotome*) harus didekontaminasi.

6. Kecelakaan di laboratorium

Di laboratorium mikrobiologi, infeksi bakteri merupakan resiko yang sering terjadi sebagai penyebab penularan utama pada petugas pemeriksa laboratorium.

Oleh sebab itu perlu diupayakan tindakan pencegahan dengan urutan prioritas sebagai berikut:

- a. Perlindungan petugas pemeriksa
 - Batasi kontaminasi
 - Dekontaminasi pegawai

- Dekontaminasi areal yang berhubungan
- b. Dekontaminasi kulit; detergen tidak boleh digunakan, perawatan harus dilakukan dengan tidak merusak kulit
- c. Dekontaminasi mata; dilakukan dengan perawatan air untuk mencegah penyebaran kontaminasi dari satu area ke area lainnya.
- d. Dekontaminasi pakaian; pakaian yang terkontaminasi harus dipindahkan secepatnya dan diletakkan pada wadah tertentu. Harus dipindahkan dari lokasi tumpahan sampai kontaminasi dapat termonitor.
- e. Dekontaminasi daerah kerja; Basahi semua daerah yang terkena tumpahan termasuk wadah yang rusak dengan desinfektan. Diamkan 10 menit. Bersihkan dengan tissue atau lap dengan menggunakan sarung tangan.

Dianjurkan desinfektan yang digunakan adalah *Hypochlorite*. Bila terjadi kecelakaan di ruang kerja laboratorium, batasi orang yang masuk di daerah tersebut sampai dilakukan monitor terhadap kontaminasi oleh petugas. Kotak peralatan P3K yang lengkap harus tersedia di laboratorium dan diletakkan di tempat yang diketahui oleh semua staf laboratorium. Sebaiknya kotak peralatan tersebut disertai dengan petunjuk lengkap tentang pertolongan pada kecelakaan, terpotong/tersengat, luka bakar, keracunan, shock/collapse serta terbaca oleh semua staff.

Setelah semua hal yang mendukung terciptanya kesehatan, keselamatan dan keamanan kerja terpenuhi, maka hal terakhir yang diperlukan untuk menyempurnakan semua kegiatan tersebut adalah mencuci tangan. Dengan cara yang sederhana ini dapat menghindarkan pekerja dari resiko penularan penyakit infeksi. Cara yang benar untuk mencuci tangan yaitu:

1. Basahi tangan setinggi pertengahan lengan bawah dengan air mengalir
2. Gunakan sabun di bagian telapak tangan yang telah basah
3. Digosok telapak tangan ke telapak tangan, sehingga menghasilkan busa secukupnya selama 15-20 detik
4. Bilas kembali dengan air bersih
5. Tutup kran dengan siku atau tissue
6. Keringkan tangan dengan tissue/handuk kertas
7. Hindarkan menyentuh benda disekitarnya setelah mencuci tangan.

Laboratorium adalah suatu tempat dimana para praktikan, dosen, peneliti dsb melakukan percobaan. Percobaan yang dilakukan menggunakan berbagai bahan kimia, peralatan gelas dan instrumentasi khusus yang dapat menyebabkan terjadinya kecelakaan bila dilakukan dengan cara yang tidak tepat. Kecelakaan itu dapat juga terjadi karena kelalaian atau kecerobohan kerja, ini dapat membuat orang tersebut cedera, dan bahkan bagi orang disekitarnya. Keselamatan kerja di laboratorium merupakan dambaan bagi setiap individu yang sadar akan kepentingan kesehatan, keamanan dan kenyamanan kerja. Bekerja dengan selamat dan aman berarti menurunkan resiko kecelakaan. Walaupun petunjuk keselamatan kerja sudah tertulis dalam setiap penuntun praktikum, namun hal ini perlu dijelaskan berulang-ulang agar setiap individu lebih meningkatkan kewaspadaan ketika bekerja di laboratorium.

Berbagai peristiwa yang pernah terjadi perlu dicatat sebagai latar belakang pentingnya bekerja dengan aman di laboratorium. Sumber bahaya terbesar berasal dari bahan-bahan kimia, oleh sebab itu diperlukan pemahaman mengenai jenis bahan kimia agar yang bekerja dengan bahan-bahan tersebut dapat lebih berhati-hati dan yang lebih penting lagi tahu cara menanggulangnya. Limbah bahan kimia sisa percobaan harus dibuang dengan cara yang tepat agar tidak menyebabkan polusi pada lingkungan. Cara menggunakan peralatan umum dan berbagai petunjuk praktis juga dibahas secara singkat untuk mengurangi kecelakaan yang mungkin terjadi ketika bekerja di laboratorium. Dengan pengetahuan singkat tersebut diharapkan setiap individu khususnya para asisten dapat bertanggung jawab untuk menjaga keselamatan kerja para praktikan di laboratorium dengan sebaik-baiknya.

Beberapa peristiwa yang pernah terjadi di laboratorium dapat merupakan cermin bagi setiap orang untuk meningkatkan kewaspadaannya ketika bekerja di laboratorium. Peristiwa-peristiwa tersebut kadang-kadang terlalu pahit untuk dikenang, namun meninggalkan kesan pendidikan yang baik, agar tidak melakukan kesalahan dua kali pada peristiwa yang sama. Peristiwa terbesar dalam sejarah Departemen Kimia adalah kejadian 27 tahun yang lalu, ketika itu Gedung Departemen terbakar pada malam menjelang pagi hari, itu terjadi karena ada bahan kimia yang meledak di gedung tersebut.

Walaupun tidak terdapat korban manusia, namun kerugian materi sangat banyak dan praktikan agak "terhambat" melakukan proses pendidikan karena diperlukan waktu yang tidak sedikit untuk dapat memenuhi keperluan fasilitas yang terbakar. Peristiwa lainnya tidak sehebat yang terjadi di atas, namun perlu perhatian khusus agar dikemudian hari jangan sampai terjadi lagi. Peristiwa itu menimpa salah seorang mantan praktikan kimia yang bekerja dengan brom, bahan ini mengalir dari peralatan yang kurang rapat, menyentuh kulit lengannya, akibatnya terjadi luka bakar dan bekasnya tidak hilang sampai sekarang. Ada pula yang terkena bahan kimia TCA ketika mengambil zat tersebut dari botol kemasannya, karena kurang hati-hati ada bahan yang terkena kulit tangan praktikan dan ini menimbulkan iritasi yang hebat, gejalanya kulit terasa gatal dan karena digaruk dapat melepuh. Kejadian berikutnya adalah ketika praktikan tahun pertama bekerja menggunakan pembakar dengan bahan bakar spiritus, pembakar tersebut tersenggol sehingga spiritus tersebut tumpah ke meja praktikum dan menyebabkan kebakaran serta merusak meja praktikum. Kebakaran juga pernah terjadi karena terlepasnya selang penyambung pembakar bunsen dari saluran gas bakar, ini disebabkan oleh praktikan yang menarik pembakar itu ke berbagai tempat. Ada pula kecerobohan kerja yang menyebabkan asam sulfat pekat tumpah di atas meja praktikum. Asam tersebut dapat menghanguskan kayu sehingga meja praktikum berubah menjadi hitam dan rapuh.

Kelalaian lainnya disebabkan oleh kurang disiplin, seperti lupa menutup kran air, sehingga terjadi banjir sampai ke laboratorium lainnya. Semua peristiwa tersebut tidak akan terjadi bila setiap individu sadar dan mengerti bahwa laboratorium itu milik bersama yang harus dijaga dengan meningkatkan disiplin.

Bahan kimia

Setiap bahan kimia itu berbahaya, namun tidak perlu merasa takut bekerja dengan bahan kimia bila tahu cara yang tepat untuk menanggulangnya. Yang dimaksud berbahaya ialah dapat menyebabkan terjadinya kebakaran, mengganggu kesehatan, menyebabkan sakit atau luka, merusak, menyebabkan korosi dsb. Jenis bahan kimia berbahaya dapat diketahui dari label yang tertera pada kemasannya. Dari data tersebut, tingkat bahaya bahan kimia dapat

diketahui dan upaya penanggulangannya harus dilakukan bagi mereka yang menggunakan bahan-bahan tersebut. Kadang-kadang terdapat dua atau tiga tanda bahaya pada satu jenis bahan kimia, itu berarti kewaspadaan orang yang bekerja dengan bahan tersebut harus lebih ditingkatkan. Contoh bahan kimia yang mudah meledak adalah kelompok bahan oksidator seperti perklorat, permanganat, nitrat dsb. Bahan-bahan ini bila bereaksi dengan bahan organik dapat menghasilkan ledakan. Logam alkali seperti natrium, mudah bereaksi dengan air menghasilkan reaksi yang disertai dengan api dan ledakan. Gas metana, pelarut organik seperti eter, dan padatan anorganik seperti belerang dan fosfor mudah terbakar, maka ketika menggunakan bahan-bahan tersebut, hendaknya dijauhkan dari api.

Bahan kimia seperti senyawa sianida, merkuri dan arsen merupakan racun kuat, harap bahan-bahan tersebut tidak terisap atau tertelan ke dalam tubuh. Asam-asam anorganik bersifat oksidator dan menyebabkan peristiwa korosi, maka hindarilah jangan sampai asam tersebut tumpah ke permukaan dari besi atau kayu. Memang penggunaan bahan-bahan tersebut di laboratorium tidak berjumlah banyak, namun kewaspadaan menggunakan bahan tersebut perlu tetap dijaga.

Peralatan dan cara kerja selain bahan kimia, peralatan laboratorium juga dapat mendatangkan bahaya bila cara menggunakannya tidak tepat. Contoh sederhana yaitu cara memegang botol reagen, label pada botol tersebut harus dilindungi dengan tangan, karena label bahan tersebut mudah rusak kena cairan yang keluar dari botol ketika memindahkan isi botol tersebut. Banyak peralatan laboratorium terbuat dari gelas, bahan gelas tersebut mudah pecah dan pecahannya dapat melukai tubuh. Khususnya bila memasukkan pipa gelas kedalam propkaret, harus menggunakan sarung tangan untuk melindungi tangan dari pecahan kaca. Pada proses pemanasan suatu larutan, harus digunakan batu didih untuk mencegah terjadinya proses lewat didih yang menyebabkan larutan panas itu muncrat kemana-mana. Juga ketika menggunakan pembakar spiritus atau pembakar bunsen, hati-hati karena spiritus mudah terbakar, jadi jangan sampai tumpah ke atas meja dan selang penyambung aliran gas pada bunsen harus terikat kuat, jangan sampai lepas.

Langkah-langkah praktis sebagai asisten di laboratorium, yang bertugas membimbing praktikan untuk bekerja dengan baik dan aman, maka perlu persiapan sebelum bekerja. Asisten perlu datang lebih awal untuk memeriksa lokasi dan cara pakai alat bantu keselamatan kerja. Selanjutnya asisten harus mengetahui jenis bahan kimia dan peralatan yang akan digunakan pada percobaan hari tersebut dan cara menanggulangi bila terjadi kecelakaan karena bahan atau peralatan tersebut. Disini kehadiran asisten mendampingi praktikan yang sedang bekerja merupakan tugas mulia dalam menjaga keselamatan kerja. Pada akhir praktikum, biasakanlah menutup kran air dan gas, mematikan listrik dan api serta mencuci tangan dan meninggalkan laboratorium dalam keadaan bersih. Ini dilakukan oleh asisten agar menjadi panutan bagi praktikan. Masih banyak hal penting yang belum diungkapkan, untuk itu disarankan agar asisten berkomunikasi dengan ketua laboratoriumnya masing-masing dalam meningkatkan kewaspadaan kerja di laboratorium. Mudah-mudahan pengetahuan singkat ini bermanfaat bagi setiap individu khususnya bagi para asisten yang bertugas membimbing praktikan melakukan praktikum, dan seluruh civitas akademika agar semua dapat menikmati keselamatan, keamanan dan kenyamanan kerja di laboratorium dan ini mendukung tercapainya tujuan pendidikan secara memuaskan.

- a. Dilarang bekerja sendirian di laboratorium, minimal ada asisten yang mengawasi.
- b. Dilarang bermain-main dengan peralatan laboratorium dan bahan kimia.
- c. Persiapkanlah hal yang perlu sebelum masuk laboratorium seperti buku kerja, jenis percobaan, jenis bahan, jenis peralatan, dan cara membuang limbah sisa percobaan.
- d. Dilarang makan, minum dan merokok di laboratorium.
- e. Jagalah kebersihan meja praktikum, apabila meja praktikum basah segera keringkan dengan lap basah.
- f. Jangan membuat keteledoran antar sesama teman.
- g. Pencatatan data dalam setiap percobaan selengkap-lengkapny.
- h. Dilarang memakai perhiasan yang dapat rusak karena bahan kimia.
- i. Dilarang memakai sandal atau sepatu terbuka atau sepatu berhak tinggi.
- j. Wanita/pria yang berambut panjang harus diikat.

- k. Biasakanlah mencuci tangan dengan sabun dan air bersih terutama setelah melakukan praktikum.
- l. Bila kulit terkena bahan kimia, janganlah digaruk agar tidak tersebar.
- m. Bila terjadi kecelakaan yang berkaitan dengan bahan kimia, laporkan segera pada asisten atau pemimpin praktikum. Segera pergi ke dokter untuk mendapat pertolongan secepatnya.

Teknik kerja di laboratorium.

Hal pertama yang perlu dilakukan

- 1. Gunakan peralatan kerja seperti kacamata pengaman untuk melindungi mata, jas laboratorium untuk melindungi pakaian dan sepatu tertutup untuk melindungi kaki.
- 2. Dilarang memakai perhiasan yang dapat rusak karena bahan kimia.
- 3. Dilarang memakai sandal atau sepatu terbuka atau sepatu berhak tinggi.
- 4. Wanita/pria yang berambut panjang harus diikat.

Bekerja aman dengan bahan kimia

- 1. Hindari kontak langsung dengan bahan kimia.
- 2. Hindari mengisap langsung uap bahan kimia.
- 3. Dilarang mencicipi atau mencium bahan kimia kecuali ada perintah khusus.
- 4. Bahan kimia dapat bereaksi langsung dengan kulit menimbulkan iritasi (pedih atau gatal).

Memindahkan bahan kimia

- 1. Baca label bahan kimia sekurang-kurangnya dua kali untuk menghindari kesalahan.
- 2. Pindahkan sesuai dengan jumlah yang diperlukan.
- 3. Jangan menggunakan bahan kimia secara berlebihan.
- 4. Jangan mengembalikan bahan kimia ke dalam botol semula untuk mencegah kontaminasi.

Memindahkan bahan Kimia cair

1. Tutup botol dibuka dan dipegang dengan jari tangan sekaligus telapak tangan memegang botol tersebut.
2. Tutup botol jangan ditaruh di atas meja karena isi botol dapat terkotori.
3. Pindahkan cairan melalui batang pengaduk untuk mengalirkan agar tidak memercik

Memindahkan bahan kimia padat

1. Gunakan tutup botol untuk mengatur pengeluaran bahan kimia.
2. Jangan mengeluarkan bahan kimia secara berlebihan.
3. Pindahkan sesuai keperluan tanpa menggunakan sesuatu yang dapat mengotori bahan tersebut.

Cara memanaskan larutan menggunakan tabung reaksi

1. Isi tabung reaksi maksimal sepertiganya.
2. Api pemanas hendaknya terletak pada bagian atas larutan.
3. Goyangkan tabung reaksi agar pemanasan merata.
4. Arahkan mulut tabung reaksi pada tempat yang aman agar percikannya tidak melukai orang lain maupun diri sendiri.

Cara memanaskan larutan menggunakan gelas kimia

1. Gunakan kaki tiga dan kawat kasa untuk menopang gelas kimia tersebut.
2. Letakkan batang gelas atau batu didih dalam gelas kimia untuk mencegah pemanasan mendadak.
3. Jika gelas kimia digunakan sebagai penangas air, isilah dengan air maksimum seperempatnya.

Keamanan kerja di laboratorium

1. Rencanakan percobaan yang akan dilakukan sebelum memulai praktikum.
1. Gunakan peralatan kerja seperti kacamata pengaman untuk melindungi mata, jas laboratorium untuk melindungi pakaian dan sepatu tertutup untuk melindungi kaki.
2. Dilarang memakai sandal atau sepatu terbuka atau sepatu berhak tinggi.

3. Wanita/pria yang berambut panjang harus diikat.
4. Dilarang makan, minum dan merokok di laboratorium.
5. Jagalah kebersihan meja praktikum, apabila meja praktikum basah segera keringkan dengan lap basah.
6. Hindari kontak langsung dengan bahan kimia.
7. Hindari mengisap langsung uap bahan kimia.
8. Bila kulit terkena bahan kimia, janganlah digaruk agar tidak tersebar.
9. Pastikan kran gas tidak bocor apabila hendak menggunakan bunsen.
10. Pastikan kran air dan gas selalu dalam keadaan tertutup pada sebelum dan sesudah praktikum selesai.

Penanggulangan keadaan darurat terkena bahan kimia

1. Jangan panik.
2. Mintalah bantuan rekan anda yang berada didekat anda.
3. Lihat data MSDS.
4. Bersihkan bagian yang mengalami kontak langsung tersebut (cuci bagian yang mengalami kontak langsung tersebut dengan air apabila memungkinkan).
5. Bila kulit terkena bahan kimia, janganlah digaruk agar tidak tersebar.
6. Bawa ketempat yang cukup oksigen.
7. Hubungi paramedik secepatnya(dokter, rumah sakit).

Kebakaran

1. Jangan panik.
2. Ambil tabung gas CO₂ apabila api masih mungkin dipadamkan.
3. Beritahu teman anda.
4. Hindari menggunakan lift.
5. Hindari menghirup asap secara langsung.
6. Tutup pintu untuk menghambat api membesar dengan cepat (jangan dikunci).
7. Pada gedung tinggi gunakan tangga darurat.
8. Hubungi pemadam kebakaran.

Gempa bumi

1. Jangan panik.
2. Sebaiknya berlindung dibagian yang kuat seperti bawah meja, kolong kasur, lemari.
3. Jauhi bangunan yang tinggi, tempat penyimpanan zat kimia, kaca.
4. Perhatikan bahaya lain seperti kebakaran akibat kebocoran gas, tersengat listrik.
5. Jangan gunakan lift.
6. Hubungi pemadam kebakaran, polisi dll.

Bahan kimia jenis B3 (berbau, berbahaya, beracun)

Bahan Berbahayadan Beracun adalah bahan-bahan yang pembuatan, pengolahan, pengangkutan, penyimpanan dan penggunaannya menimbulkan atau membebaskan debu, kabut, uap, gas, serat, atau radiasi sehingga dapat menyebabkan iritasi, kebakaran, ledakan, korosi, keracunan dan bahaya lain dalam jumlah yang memungkinkan gangguan kesehatan bagi orang yang berhubungan langsung dengan bahan tersebut atau menyebabkan kerusakan pada barang-barang. 3 macam bahan kimia dalam kelompok besar :

- a) Industri Kimia, yaitu industri yang mengolah dan menghasilkan bahan-bahan kimia, diantaranya industri pupuk, asam sulfat, soda, bahan peledak, pestisida, cat, deterjen, dan lain-lain. Industri kimia dapat diberi batasan sebagai industri yang ditandai dengan penggunaan proses-proses yang bertalian dengan perubahan kimiawi atau fisik dalam sifat-sifat bahan tersebut dan khususnya pada bagian kimiawi dan komposisi suatu zat.
- b) Industri Pengguna Bahan Kimia, yaitu industri yang menggunakan bahan kimia sebagai bahan pembantu proses, diantaranya industri tekstil, kulit, kertas, pelapisan listrik, pengolahan logam, obat-obatan dan lain-lain.
- c) Laboratorium, yaitu tempat kegiatan untuk uji mutu, penelitian dan pengembangan serta pendidikan. Kegiatan laboratorium banyak dipunyai oleh industri, lembaga penelitian dan pengembangan, perusahaan jasa, rumah sakit dan perguruan tinggi.

1. Karakteristik Bahan Kimia

Berdasarkan hukum pasal 1 ayat 1 Bahan Berbahaya dan Beracun (B3) adalah bahan yang karena sifat dan atau konsentrasinya dan atau jumlahnya, baik secara langsung maupun tidak langsung, dapat mencemarkan dan atau merusak lingkungan hidup dan atau dapat membahayakan lingkungan hidup, kesehatan, kelangsungan hidup manusia serta makhluk hidup lainnya.

Bahan Kimia B3 memiliki karakteristik berdasarkan klasifikasi B3 (Pasal 5 ayat 1 Pemerintah) sebagai berikut:

- a. Mudah meledak (explosive).
- b. Pengoksidasi (oxidizing).
- c. Sangat mudah sekali menyala (extremely flammable).
- d. Sangat mudah menyala (highly flammable).
- e. Amat sangat beracun (highly flammable).
- f. Sangat beracun (highly beracun).
- g. Beracun (moderately toxic).
- h. Korosif (corrosive).
- i. Bersifat Iritasi (irritant).
- j. Berbahaya bagi lingkungan (*dangerous to the environment*).
- k. Karsinogenik (*carcinogenic*).
- l. Teratogenik (*teratogenic*).
- m. Mutagenik (*mutagenic*).

Untuk mendeteksi kandungan B3 dalam limbah dapat dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif. Uji kualitatif adalah *Screening test* atau *Fingerprint test*. Uji kualitatif ini untuk mengetahui karakteristik suatu limbah dengan maksud untuk mengantisipasi langkah-langkah dan penanganan limbah tersebut serta untuk membedakan/mengidentifikasi suatu jenis limbah dengan limbah lainnya. Uraian beberapa parameter dalam *Screeningtest/Fingerprint test* yang dapat dijadikan indikasi awal karakteristik limbah B3 dijelaskan sebagai berikut:

1. pH; Hasil pengukuran pH jika pH kurang lebih sama dengan 5 atau pH kurang lebih sama dengan 12,5, maka limbah tersebut dapat dinyatakan sebagai golongan limbah B3 karena bersifat korosif.

2. Reaktifitas Air; Reaktifitas air ini merupakan suatu parameter untuk menguji reaktifitas menggunakan air. Suatu limbah dapat dinyatakan bersifat reaktif apabila dalam pengujiannya terjadi gejala-gejala seperti adanya pelepasan gas, terbentuknya emulsi, perubahan temperatur dan lain-lain.
3. Pengoksidasi; Dalam pengujian pengoksidasi ini apabila suatu limbah menunjukkan adanya kandungan senyawa oksidan (oksidan positif), maka dapat diambil kesimpulan bahwa limbah tersebut mempunyai indikasi sebagai limbah B3. Karena apabila senyawa oksidan bercampur dengan senyawa organik dapat bereaksi secara spontan menghasilkan panas, gas atau bahkan menimbulkan ledakan.
4. Mudah Terbakar; Seperti kita ketahui bahwa salah satu karakteristik bahan kimia B3 adalah mudah meledak atau mudah terbakar. Sehingga ketika suatu limbah didekatkan pada suatu nyala api, apabila sampel langsung terbakar maka dapat diindikasikan limbah tersebut memiliki karakteristik mudah terbakar.
5. Kandungan Amonia; Dalam hal ini gas amonia perlu diuji karena termasuk gas yang beracun. Apabila suatu limbah mengandung gas amonia, dapat dinyatakan bahwa limbah tersebut kemungkinan termasuk kedalam limbah B3, karena apabila bercampur dengan suatu basa maka akan bersifat reaktif.
6. Kandungan Sianida; Sama halnya dengan amonia, gas sianida ini merupakan gas yang beracun dan mematikan. Apabila suatu limbah mengandung sianida positif, maka dapat dinyatakan bahwa limbah tersebut kemungkinan termasuk kedalam limbah B3, karena apabila bercampur dengan suatu asam maka akan bersifat reaktif.
7. Kandungan Sulfida; Gas sulfida merupakan gas yang beracun dan mematikan. Apabila suatu limbah mengandung sianida positif, maka dapat dinyatakan bahwa limbah tersebut kemungkinan termasuk kedalam limbah B3, karena apabila bercampur dengan suatu asam maka akan bersifat reaktif.

Limbah B3 memiliki sifat mudah terbakar dan meledak, dan limbah tersebut bisa berupa gas, cair, ataupun padat dengan karakteristik yang berbeda. Limbah yang bersifat reaktif adalah limbah-

limbah yang mempunyai beberapa sifat berikut: 1) limbah yang pada keadaan normal tidak stabil dan dapat menyebabkan perubahan tanpa peledakan. 2) limbah yang dapat bereaksi hebat dengan air. 3) apabila tercampur air akan meledak, menghasilkan gas, uap, asap beracun yang membahayakan bagi manusia dan lingkungan. 4) limbah sianida, sulfida, atau amoniak yang dapat membahayakan kesehatan manusia. 5) limbah yang mudah meledak atau bereaksi pada suhu dan tekanan standar (25°C, 760 mm/HG). 6) limbah yang menyebabkan kebakaran karena melepas/menerima oksigen.

Limbah beracun adalah limbah yang mengandung pencemar yang bersifat beracun bagi manusia atau lingkungan yang dapat menyebabkan kematian atau sakit yang serius apabila masuk ke dalam tubuh melalui pernapasan, kulit, atau mulut. Limbah yang menyebabkan infeksi ialah bagiantubuh manusia yang diamputasi dan cairan dari tubuh manusia yang terkena infeksi, limbah dari laboratorium atau limbah lainnya yang terinfeksi kuman penyakit yang dapat menular. Limbah yang bersifat korosif adalah limbah yang bersifat: 1) menyebabkan iritasi pada kulit. 2) menyebabkan proses pengkaratan pada lempeng baja dengan laju korosi lebih besar dari 6,35 mm/tahun dengan temperatur 55°C. 3) mempunyai pH sama atau kurang dari 2 untuk limbah bersifat asam atau lebih besar dari 12,5 untuk bersifat basa.

2. Sumber Limbah B3

Jenis limbah B3 menurut sumbernya meliputi :

- Limbah B3 dari sumber tidak spesifik (sebagaimana lampiran I tabel 1 PP 85/1999) yaitu limbah B3 yang pada umumnya berasal bukan dari proses utamanya melainkan dari kegiatan pemeliharaan alat, pencucian, pencegahan korosi, pelarutan kerak, pengemasan dan lain-lain.
- Limbah B3 dari sumber spesifik (sebagaimana lampiran I tabel 2 PP85/1999) yaitu sisa proses suatu industri atau kegiatan yang secara spesifik dapat ditentukan berdasarkan kajian ilmiah.

- Limbah B3 dari bahan kimia kadaluarsa, tumpahan, bekas kemasan dan buangan produk yang tidak memenuhi spesifikasi (sebagaimana lampiran I tabel 3 PP 85/1999).

3. Dampak B3 terhadap kesehatan manusia

Limbah B3 masuk ke lingkungan melalui media air, tanah, udara, dan hewan/ biota yang mempengaruhi secara kontinyu dan tidak kontinyu, bertahap dan seketika, teratur dan tidak teratur. Limbah B3 meracuni makhluk hidup melalui rantai makanan sehingga menyebabkan organisme (tumbuhan, hewan dan manusia) terpapar oleh zat-zat beracun.

Limbah B3 mempengaruhi kesehatan dengan mencelakakan manusia secara langsung (akibat ledakan, kebakaran, reaktif dan korosif) dan maupun tidak langsung (toksik akut dan kronis) bagi manusia. Zat toksik (racun) yang dihasilkan oleh limbah B3 masuk ke tubuh manusia melalui:

- Oral yaitu melalui mulut dan kemudian saluran pencernaan, sulit mencapai peredaran darah.
- Inhalasi yaitu melalui saluran pernapasan, bersifat cepat memasuki peredaran darah.
- Dermal yaitu melalui kulit sehingga mudah masuk ke dalam peredaran darah.
- Peritonal yaitu melalui suntikan, langsung memasuki peredaran darah.

Dampak limbah B3 terhadap kesehatan manusia salah satu contohnya yaitu kasus Penyakit Minamata : Dipinggir teluk Minamata di Jepang bermukim rakyat nelayan. Para nelayan rupanya telah terbiasa mengkonsumsi ikan yang berasal dari teluk tersebut. Akan tetapi teluk tersebut sudah tercemar limbah, yang diakibatkan oleh beberapa industri membuang limbah ke teluk Minamata. Para ahli kimia pabrik mengatakan bahwa limbah pabrik mengandung methylmercury yang tidak berbahaya, namun kenyataannya fitoplankton, zooplankton dan ikan yang ada di teluk tetap hidup. Namun, setelah terakumulasinya methylmercury sekitar 10 tahun, tanpa disadari telah berlipat ganda

ribuan kali mercury di dalam tubuh nelayan. Karena methylmercury termasuk logam berat, maka akan menimbulkan dampak kesehatan yaitu keturunan dari nelayan yang telah mengkonsumsi ikan dari teluk Minamata mengalami cacat jasmani dan mental. Jadi penyakit sejenis penyakit Minamata dapat terjadi dimana saja, melalui proses akumulasi dan penggandaan biologik.

4. Toksikologi Limbah B3

Menurut PP No. 85 tahun 1999, selain berdasarkan sumber dan uji karakteristik, suatu limbah B3 dapat juga diidentifikasi berdasarkan uji toksikologi. Uji toksikologi digunakan untuk mengetahui sifat akut atau kronik limbah yang dimaksud. Penentuan sifat akut limbah dilakukandengan uji hayati untuk mengukur hubungan dosis - respons antara limbah dengan kematian hewan uji, untuk menetapkan nilai LD50.

LD50 (*Lethal Dose fifty*) adalah dosis limbah (gram / Kg Berat Badan) yang dapat menghasilkan 50% respons kematian pada populasi hewan uji. Nilai tersebut diperoleh dari analisis data secara grafis dan atau statistik terhadap hasil uji hayati tersebut. Sifat kronis limbah B3 (toksik, mutagenik, karsinogenik, teratogenik) ditentukan dengan cara mengevaluasi sifat zat pencemar yang terdapat dalam limbah dengan cara mencocokkan zat pencemar tersebut dengan lampiran III PP 85/1999.

5. Hukum dalam Penanganan Limbah B3

Limbah B3 perlu dikelola sebab jumlah dan jenis bahan kimia yang beredar meningkat. Dengan beredarnya segala jenis limbah B3, maka banyak terjadi kasus-kasus kecelakaan, keracunan, atau gangguan kesehatan serta lingkungan yang disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya: penanganan dan penggunaan pestisida yang kurang baik dan tepat, peredaran bahan kimia berbahaya yang sudah dilarang (arsen, garam dan sianida), sistem pengemasan dan penandaan (simbol/label yang tidak memadai), sistem penyimpanan yang tidak memenuhi persyaratan teknis.

Dengan kasus-kasus di atas, maka perlu dilakukan pengelolaan limbah B3 yang baik dan benar. Pengelolaan limbah B3 merupakan

suatu rangkaian kegiatan yang mencakup penyimpanan, pengumpulan, pemanfaatan, pengangkutan, dan pengolahan limbah B3 termasuk penimbunan hasil pengolahan tersebut (PP No.18 & 85 tahun 1999). Dengan Pengolahan limbah sebagaimana tersebut di atas, maka mata rantai siklus perjalanan limbah B3 sejak dihasilkan oleh penghasil limbah B3 sampai penimbunan akhir oleh pengolah limbah B3 dapat diawasi. Penanganan limbah B3 secara umum dapat dilakukan dengan cara, diantaranya:

- Daur ulang atau *recovery* dengan memanfaatkan kembali bahan baku dengan metoda daur ulang atau *recovery*.
- Pembakaran (*Insinerator*) yaitu memusnahkan dengan cara pembakaran pada alat pembakar khusus.
- Proses detoksifikasi dan netralisasi dengan mengurangi kadar racun.
- Penimbunan/penanaman (*Landfill*). Penanganan secara penimbunan dilakukan terhadap limbah padat dan residu dari proses solidifikasi, sisa dari proses daur ulang, sisa pengolahan fisik-kimia, katalis, ter, lumpur padat (*sludge*) dan berbagai limbah yang tidak dapat diolah atau diproses lagi.

Pertolongan Pertama pada Kecelakaan (P3K) di laboratorium mikrobiologi

Bekerja di laboratorium membutuhkan ketelitian dan kewaspadaan mengingat peralatan dan bahan yang digunakan mengandung potensi bahaya. Kecelakaan dapat terjadi kapan saja dengan berbagai akibat yang membahayakan kesehatan bahkan keselamatan jiwa pengguna laboratorium. Karena kecelakaan laboratorium kejadiannya selalu mendadak, kekagetan yang ditimbulkan dan rasa takut melihat akibatnya membuat orang menjadi panik. Bisa ditebak, jika korban tidak segera mendapatkan pertolongan yang tepat dan atau mendapatkan penanganan yang keliru, nyawa korban yang menjadi taruhannya. Oleh karena itu, pengetahuan tentang Pertolongan Pertama pada Kecelakaan (P3K) penting untuk dimiliki orang-orang yang bekerja di laboratorium.

Kecelakaan Laboratorium

Kecelakaan di laboratorium dapat menimpa siapa saja, bukan hanya pemakai lab melainkan juga pengunjung bahkan pembersih lab. Penyebab kecelakaan bisa dari faktor kimia seperti kontak dengan zat asam dan atau basa, faktor fisika seperti tersetrum listrik, serta faktor biologis seperti tergigit hewan coba. Pada setiap kecelakaan lab di sekolah khususnya, akan selalu diikuti dengan kekacauan dan kepanikan. Sebagai guru penanggung jawab P3K di lab, yang harus dilakukan pertama kali adalah menghilangkan kerumunan praktikan di sekitar korban dan menata tempat kejadian, memberikan ruang terbuka yang adekuat untuk melakukan tindakan P3K, serta menenangkan dan mengamankan korban.

Pengertian, Tujuan dan Prinsip P3K

Pengertian pertolongan pertama pada kecelakaan adalah pertolongan yang diberikan segera setelah kecelakaan dengan memberikan pengobatan dan perawatan darurat bagi korban sebelum pertolongan yang lebih akurat diberikan oleh dokter ahli. Walaupun tindakan P3K ini bersifat sementara, tindakan P3K ini diharapkan dapat mengurangi penderitaan, masa perawatan di rumah sakit dan kecacatan pada korban. Pertolongan yang diberikan bersifat sederhana dengan peralatan dasar sederhana yang langsung diberikan di tempat kejadian kecelakaan dalam hal ini di laboratorium, sehingga tindakan P3K tidaklah dimaksudkan untuk memberikan pertolongan sampai selesai. Komplikasi seperti kecacatan atau infeksi penyerta akibat kecelakaan. P3K juga bertujuan mengurangi rasa nyeri dan cemas serta menjaga ketenangan fisik dan mental penderita, sehingga akhirnya menunjang upaya penyembuhan.

Prinsip pokok P3K disingkat dengan DRABC, yaitu: D(*danger*, petugas P3K harus mengamankan dahulu situasi dan kondisi sebelum menangani korban), R(*response*, melakukan penilaian kesadaran kepada korban secara langsung (ditepuk pipi, digoyangkan bahunya) maupun secara tidak langsung (dipanggil), A(*airway*, yaitu mengamankan jalan napas korban dengan membersihkan jika ada sumbatan atau benda asing), B(*breathing*, yaitu mengecek laju pernapasan korban, menjaga pernapasan korban agar tetap berlangsung dengan baik, melakukan pernapasan buatan dari mulut jika terlihat pernapasan berhenti), serta

C(*circulation*, melakukan pemeriksaan tanda vital korban seperti denyut jantung, denyut nadi dan laju pernapasan korban). Jika korban sadar, posisikan dan pertahankan jalan napasnya. Jika tidak ada tanda-tanda korban bernapas, berarti korban mengalami gangguan pernapasan. Penyebab gangguan bernapas adalah sumbatan jalan napas seperti ketika praktikan tersedak suatu benda, atau tak sengaja menelan benda yang berukuran besar, kelemahan atau kejang otot pernapasan, dan menghisap asap/gas beracun karena kebocoran gas berbahaya di laboratorium misal ether, khloroform, aerosol, dsb. Jika korban tersedak lakukan manuver seperti memukul dengan kuat bagian punggung diantara tulang belikatnya dengan posisi korban dalam keadaan membungkuk, atau mendekap korban dari belakang dan menekan keras-keras bagian tengah perutnya.

Bila tidak ditemukan tanda-tanda korban bernapas spontan, tindakan yang dilakukan adalah memberikan pernapasan bantuan dengan:

- 1) Praktikan dalam keadaan terlentang dan kepala ditengadahkan,
- 2) Bersihkan jalan pernapasan (hidung, mulut, dan kerongkongan),
- 3) Memposisikan leher dalam keadaan ekstensi (menengadahkan) dengan *manuver Head Tilt*, membuka lebar-lebar mulut korban dengan *manuver Chin Lift* dan menarik rahang bawah korban dengan *manuver Jaw Thrust*. sementara penolong jongkok disamping korban, memasukkan O₂ dan mengeluarkan CO₂ pada praktikan sampai sadar dengan dengan cara yaitu: a) penolong menghisap napas sebanyak mungkin, b) hembuskan ke mulut korban dan usahakan tidak ada udara yang bocor dengan cara menutup lubang hidung praktikan dengan jari, c) tiup via mulut: Dewasa 10 - 12 x/menit, interval 5 hitungan,
- 4) Perhatikan udara yang masuk ke paru-paru praktikan apakah dadanya terlihat mengembang, jika ada bukti dada mengembang, lepaskan mulut penolong agar udara pernapasan praktikan dapat dibiarkan keluar dari hidung dan mulut,
- 5) Lakukan hal ini beberapa kali dan jika ada luka di mulut praktikan, lakukan pernapasan pada hidung praktikan dengan menutup mulut. Pada pemberian bantuan napas buatan ini yang perlu diperhatikan adalah tidak efektif jika ada kebocoran karena lubang hidung tidak tertutup sepenuhnya atau mulut penolong tidak bisa

sepenuhnya melingkupi mulut korban, kegagalan mempertahankan posisi jalan napas tetap terbuka dan adanya obstruksi jalan napas yang pembersihannya tidak sempurna.

Jika denyut jantung tidak ada, lakukan *Resusitasi Kardiopulmoner* (RKP) atau *Resusitasi Jantung Paru* (RJP) yang merupakan gabungan dari pertolongan napas buatan dengan pijat luar jantung, digunakan ketika seorang korban mengalami henti jantung dan henti napas. Adapun korban yang membutuhkan RJP syaratnya yaitu korban tidak berespon, tidak bernapas, denyut nadi karotis tidak teraba atau lemah yang mengindikasikan gangguan sirkulasi. RJP dilakukan dengan membaringkan korban terlentang pada permukaan yang keras (lantai, papan, meja, dsb). Posisikan penolong berjongkok disamping korban, tentukan titik kompresi yaitu 2 jari dari ujung tulang dada (*processus xiphoideus* tulang sternum), tekan dengan menekankan pangkal telapak tangan (2 telapak tangan saling menumpuk) dalamnya sekitar 4-5 cm. Satu siklus terdiri dari 2x tiupan ke mulut, 15x tekanan dada dst (jika penolong 1 orang) atau 5x tekan dada dan 1x tiupan mulut (jika penolong 2 orang). Lakukan pengecekan napas dan denyut nadi di arteri karotis, jika belum cukup kuat dilakukan pengulangan. Korban dapat tertolong jika RJP efektif, namun jika RJP tidak efektif dapat menimbulkan komplikasi seperti cedera pada tulang rusuk, luka dan perdarahan dalam, serta patah tulang pada tulang rawan dada.

Setelah Prinsip DRABC diterapkan, maka bisa dilakukan pemeriksaan untuk mengetahui ada tidaknya cedera/kegawatan lain yang menyertai. Apabila ada pendarahan dihentikan secepatnya. Upayakan agar penderita tetap sadar. Korban yang tidak sadar dan yang diduga mempunyai luka di perut tidak diberikan makanan atau minuman. Korban yang mengalami luka bakar atau keracunan, dalam keadaan sadar diberikan minuman dalam jumlah yang banyak, Lakukan tindakan P3K secara cepat, tepat, dan hati-hati. Tetaplah berjaga mewaspadaai ancaman bahaya selanjutnya bagi korban. Tindakan dilakukan untuk menenangkan korban. Jika ada tanda syok, telentangkan korban dengan letak kepala lebih rendah dari pada bagian tubuh lain. Apabila korban muntah-muntah dalam keadaan setengah sadar baringkanlah telungkup dengan letak kepala lebih rendah dari bagian tubuh lainnya. Cara ini juga dilakukan untuk korban-korban

yang dikhawatirkan akan tersedak oleh darah, muntahan atau cairan lain kedalam paru-parunya. Korban tidak boleh dipindahkan dari tempatnya sebelum dapat dipastikan jenis serta keparahan cedera yang dialami. Jika hendak diusung, hentikan perdarahan dan tulang yang patah harus di bedahi. Ketika diusung, kepala korban ada didekap pengusung yang belakang agar dapat memperhatikan keadaan korban.

Kasus Kecelakaan Laboratorium dan Tindakan Pertolongannya

1. Pingsan (sinkop)

Pingsan adalah keadaan kehilangan kesadaran sementara (sebentar) karena aliran darah ke otak berkurang, sehingga otak tidak mendapat cukup glukosa dan oksigen. Kejadiannya bisa berlangsung mendadak, cepat atau sebelumnya korban sudah merasakan mau pingsan. Agar tubuh tetap sadar, bagian otak yang dikenal dengan sistem pengaktif retikuler yang terletak di batang otak harus mendapat cukup aliran darah dan setidaknya satu belahan otak harus berfungsi. Pada kondisi pingsan, aliran darah mengumpul di bawah tubuh sehingga hanya sedikit yang didistribusikan ke otak.

Pingsan adalah salah satu mekanisme pertahanan alami dari tubuh untuk meminimalkan kerusakan yang terjadi dalam tubuh. Faktor-faktor yang menyebabkan pingsan antara lain overstimulasi sistem saraf vagus (nyeri, ketakutan, emosi kemarahan, panik, stress, dan rasa sakit yang kuat), perubahan tekanan darah (karena terlalu lama berdiri atau karena aktivitas fisik yang berlebihan dan kurang istirahat), anemia (kurangnya asupan zat besi, penyakit atau perdarahan), dehidrasi (karena muntah, diare, kurang minum, keringat berlebihan dan luka bakar), syok, obat-obatan tertentu, hipoglikemia (misalnya karena puasa, terlambat makan, tidak sarapan), serta ketidakseimbangan elektrolit. Pingsan pada lansia lebih berbahaya daripada pingsan pada remaja dan orang dewasa.

Pertolongan pada keadaan pingsan bertujuan memperbaiki aliran darah ke otak, menenangkan dan menyamankan praktikan setelah sadar. Adapun tindakan yang dilakukan pada kondisi ini adalah sebagai berikut:

- a. Pencegahan; Jika praktikan merasa mau pingsan (pusing berputar, mual, keringat dingin, penglihatan kabur, telinga berdenging),

dudukkan praktikan di lantai dan mintalah dia untuk meletakkan kepalanya diantara lututnya dan menarik napas panjang (membungkuk). Jika ada kecurigaan cedera leher, cedera kepala serius, cedera syaraf spinal, orang dengan gangguan pernapasan dan riwayat penyakit jantung, manuver ini tidak boleh dilakukan. Jika praktikan sudah membaik, ketika berdiri lakukan perlahan-lahan.

- b. Pertolongan; Lakukan DR (Lindungi korban dari bahaya dan cedera, Pastikan korban mendapat udara segar dengan membaringkannya di tempat yang nyaman, teduh, serta diatas alas yang datar, Rangsang kesadaran korban dengan memberi wangi-wangian atau minyak gosok di depan hidung). Baringkan korban dengan kaki ditinggikan dan ditopang misalnya dengan bantal atau tas. Buka baju terutama bagian atas, kendorkan pakaian bawah, pakaian dalam yang ketat, ikat pinggang, dan segala sesuatu yang menekan leher. Lap dahi dan wajah dengan air panas – dingin bergantian (jangan disiram). Jika korban mau muntah, miringkan kepala korban agar muntahan tidak tersedak masuk ke paru-paru. Setelah pulih, tenangkan korban dan beri dukungan emosional. Dudukkan korban secara bertahap, namun korban sebaiknya baru diberikan minum setelah benar-benar sadar untuk menghindari masuknya minuman ke saluran pernapasan.
- c. Segera mencari pertolongan medis; Jika praktikan mengalami pingsan berulang, hilang kesadaran ketika duduk atau berbaring, muntah untuk alasan yang tidak jelas, tidak segera bangun jika dirangsang dengan bau-bauan dalam waktu > 5 menit, maka segera rujuk praktikan ke sarana kesehatan terdekat.

1. Perdarahan

Perdarahan adalah hilangnya darah dari pembuluh darah. Perdarahan lokal perlu segera diatasi agar tidak terjadi kehilangan darah dalam jumlah yang banyak yang berujung ke syok dan terjadi kematian. Jenis perdarahan ada dua, yaitu perdarahan keluar tubuh dan perdarahan ke dalam tubuh, seperti di dalam rongga dada, rongga perut, dan otak. Secara umum cara mengatasi perdarahan adalah mengatasi perdarahan, mencegah syok, mencegah infeksi dan mengatur pemindahan korban ke RS. Pertolongannya adalah sbb:

- Jika luka tertutup pakaian, lepaskan pakaian atau digunting.
- Baringkan korban
- Bagian tubuh yang berdarah ditinggikan
- Tekan bagian yang berdarah dengan kassa steril, gunakan jari atau telapak tangan dapat pula dua jari tangan jika luka cukup lebar
- Pembuluh nadi yang terletak antara tempat perdarahan dengan jantung ditekan
- Luka dibersihkan, dibalut jangan terlalu keras supaya tidak menghambat sirkulasi. Kalau masih merembes, balut lagi diatas balutan.
- Korban dibawa kerumah sakit.

Torniket, yaitu mengikat pembuluh darah terdekat dengan luka sangat jarang digunakan karena dapat merusak syaraf dan pembuluh darah serta mempercepat kematian jaringan. Sehingga, torniket hanya digunakan apabila terjadi perdarahan hebat yang sulit dihentikan. Perdarahan di bawah kuku Jika praktikan terjepit pintu, terpukul benda tumpul atau kejatuhan benda yang berat maka mungkin terjadi perdarahan di bawah kuku yang akan terlihat merah, nyeri, bahkan dapat terkelupas. Pertolongan yang dapat diberikan yaitu dengan mengkompres jari yang cedera dengan es atau air es, membuat lubang atau menggunting kuku agar cukup terbuka untuk mengalirnya darah keluar. Jika darah sudah keluar beri salep antibiotik dan diplester.

Mimisan; perdarahan hidung ini paling sering terjadi akibat pecahnya pembuluh darah di dalam hidung. Sebenarnya mimisan akan berhenti sendiri dan jarang memerlukan perawatan medis, namun pendarahan yang terlihat hebat dapat membuat panik korban maupun penolong. Pertolongannya dengan meminta korban untuk duduk dengan kepala ditundukkan jauh ke depan agar darah tidak terisap masuk ke paru-paru, menekan kedua lubang hidung selama 5 menit dan meminta korban bernapas dengan mulut. Jangan biarkan korban berbicara, menelan, meludah, batuk maupun bersin karena mengganggu pembekuan darah, berikan lap atau tissue bersih untuk menyeka darah. Setelah 10 menit minta korban melepaskan pijitan hidung, jika masih berdarah tekan lagi selama 10 menit. Setelah perdarahan teratasi,

bersihkan sekitar mulut dan hidung dengan air hangat sementara posisi korban tetap menunduk ke depan. Sarankan korban agar istirahat dengan tenang dan jangan menghembuskan napas kuat-kuat melalui hidung. Jika terjadi perdarahan lebih dari 30 menit segera bawa ke RS terdekat.

Perdarahan Mulut; perdarahan mulut dapat disebabkan karena luka pada hidung, bibir dan pinggiran mulut dari yang ringan sampai cedera yang berbahaya. Perdarahan dapat pula berasal dari gusi karena gigi tanggal atau cabut gigi. Pertolongannya dengan menyuruh korban duduk, menundukkan kepala, memiringkan kepala ke sisi yang sakit supaya darah mengalir keluar. Letakkan bantalan kasa steril diatas luka dan dijepit dengan jari-jari dan ibu jari korban selama 10 menit atau jika dari gusi, letakkan diatas gusi yang berdarah dan minta korban menggigitnya. Jangan menelan tetesan darah di dalam mulut karena dapat memicu muntah, serta korban jangan dulu minum minuman panas selama 12 jam. Jika luka lebar dan perdarahan tidak berhenti lebih dari 30 menit segera bawa ke RS terdekat.

2. Luka

Luka merupakan keadaan dimana terjadi kerusakan dalam kontinuitas kulit dan jaringan bawah kulit (terbuka) atau jika terputusnya kontinuitas kulit dibawah kulit saja, kulit tetap utuh/intak dinamakan luka tertutup. Berikut jenis luka dan perawatannya :

Luka; Luka yang terjadi karena jatuh bergeser pada permukaan yang keras dan kasar misalnya karena jatuh terseret atau terkena percikan api. Biasanya lapisan kulit terkelupas dan membekas berupa daerah yang kasar dan lunak. Partikel debu-kotoran yang terbawa sering menimbulkan infeksi tambahan. Pertolongannya dengan membersihkan luka dengan air dingin atau hangat, mengalir dan bukan dicelupkan. Antiseptik sebaiknya ditambahkan untuk membantu membersihkan luka. Diberi betadin, dan ditutup dengan kasa steril kemudian diplester atau dibalut. Bawa korban ke RS terdekat untuk mendapatkan suntikan anti tetanus. Jika luka cukup lebar dan terbuka, lakukan desinfeksi dengan meletakkan kasa steril di tengah luka sebelum luka dibasuh dengan air sabun dan dicuci dengan antiseptik.

Setelah kasa tersebut diambil, luka disiram kembali dengan air bersih dan kotoran yang masih tertinggal diambil dengan pinset steril. Luka kemudian ditutup dengan sofratulle (kassa steril yang sudah diberi salep antibiotik) kemudian di atasnya diberi kasa steril tebal kemudian dibalut.

Luka iris; Luka akibat benda tajam seperti pisau atau pecahan kaca. Luka iris yang pendek dan dangkal, dibersihkan dengan air matang bersih, diberi obat merah atau antiseptik, dirapatkan dan dibalut, atau ditutup dengan plester atau kain kasa yang bersih. Luka iris yang dalam dan panjang, dibersihkan dan ditutup dengan kain kasa steril, korban dibawa ke Puskesmas atau rumah sakit.

Luka tusuk; Luka yang disebabkan oleh benda berujung runcing seperti paku, jarum atau tertikam. Luka dibersihkan, ditutup, dan korban dibawa ke Puskesmas atau rumah sakit untuk mendapat suntikan anti tetanus.

Luka memar; Luka tertutup dimana kerusakan jaringan dibawah kulit disertai perdarahan yang dari luar tampak kebiruan. Penanganannya dengan kompres air hangat –dingin bergantian, dan meninggikan bagian yang luka. Pencegahan yang dapat dilakukan anda agar praktikan tidak teluka, tebetur atau tertumbuk adalah letakkan benda yang membahayakan yaitu yang tajam dan benda lainnya pada tempat yang aman bagi praktikan, kemudian jelaskan kepada praktikan dan orang di sekeliling praktikan mengenai bahaya terluka, terbentur, dan tertumbuk.

3. Terbakar

Penyebab praktikan terbakar dapat berasal dari api, uap panas, dan benda panas berupa cairan (air, minyak, dan gula), benda padat (setrika, rokok, peralatan masak, dan lampu), dan bahan kimia, seperti air aki, serta sengatan listrik atau petir. Sebagai guru, anda harus berpikir jernih dan cepat ketika menghadapi kasus anak terbakar. Segera peringatkan praktikan yang lain, dan minta mereka keluar. Segera baringkan korban dengan bagian yang terbakar berada diatas, padamkan api dengan menyiramkan air atau dengan alat pemadam kebakaran. Selimuti korban dengan mantel atau selimut (bukan dari bahan yang mudah terbakar), kemudian baringkan di lantai. Perhatian jangan menggunakan bahan yang mudah terbakar ketika memadamkan api, dan jangan menggulingkan korban di tanah karena api dapat

menjalar menimbulkan luka baru. Apabila praktikan terbakar maka kita harus menilai dahulu derajat luka bakarnya untuk bisa memberikan pertolongan yang tepat. Tingkatan luka bakar adalah sbb:

- Luka bakar ringan, yaitu luka bakar yang hanya mengenai lapisan luar kulit dan kurang dari 20% luas permukaan tubuh. Misalnya ketumpahan teh atau kopi panas, terpercik minyak, atau memegang benda panas. Tandanya kulit merah, agak bengkak-lunak, nyeri tekan dan sakit.
- Luka bakar sedang, yaitu luka bakar yang merusak setengah ketebalan kulit dan kurang dari 50% luas permukaan tubuh. Pada umumnya dapat sembuh sendiri tanpa bantuan medis namun kalau luas berbahaya. Tandanya kulit terbakar berwarna merah, melepuh dan bengkak berisi cairan serta kulitnya kasar, dan nyeri hebat. Misalnya terkena air panas atau knalpot motor.
- Luka bakar berat, yaitu luka bakar yang mengenai seluruh lapisan kulit termasuk lapisan germinal di bawah kulit, serta mengenai syaraf, otot dan lemak. Kulit tampak pucat seperti lilin atau terkadang hangus, tidak akan terasa nyeri karena syaraf sudah rusak.

Penanganannya terhadap luka bakar dan sengatan aliran listrik/kilat.

- Luka bakar ringan, dinginkan bagian tubuh yang terkena dengan menyiram menggunakan air bersih yang dingin dan mengalir (bukan air es) sampai berkurang rasa sakitnya
- Luka bakar sedang, lepuh tidak boleh dipecahkan jika pecah bersihkan dan tutup dengan salep luka bakar. Luka ditutup dengan kain kasar steril.
- Luka bakar berat, Luka ditutup dengan kasa steril dan anak dibawa ke Puskesmas atau rumah sakit.

Pada penanganan luka bakar sebaiknya penolong jangan mencoba melepaskan apapun yang melekat pada luka karena bisa terjadi kerusakan yang lebih parah dan menyebabkan infeksi, jangan menyentuh atau mengusik luka, jangan memakai pasta gigi, krim atau minyak apapun pada kulit yang terbakar, jangan memecahkan lepuh (gelembung) jika tidak memiliki alat steril, jangan menggunakan bahan berbulu atau plester pada luka bakar.

BAB III TEKNIK ASEPTIS

A. Pengertian, Tujuan dan Macam-macam Sterilisasi

Dalam bidang mikrobiologi baik dalam pengerjaan penelitian atau praktikum, keadaan steril merupakan syarat utama berhasil atau tidaknya pekerjaan kita di laboratorium. **Sterilisasi** adalah cara untuk mendapatkan suatu kondisi bebas mikroorganisme atau setiap proses yang dilakukan baik secara fisika, kimia, dan mekanik untuk membunuh semua bentuk kehidupan terutama mikroorganisme. Metode atau cara sterilisasi tergantung pada jenis, macam dan sifat alat atau bahan yang disterilkan, misalnya ketahanan terhadap panas, wujud padat, cair, bentuk, ukuran dan sebagainya. Pada dasarnya sterilisasi pada bidang mikrobiologi bertujuan agar: (1) Alat atau bahan bebas dari mikroorganisme sebelum digunakan dan (2) mikroorganisme yang ditumbuhkan pada medium tidak terganggu oleh mikroorganisme lain.

Pembagian jenis mikroorganisme berdasarkan ketahanannya terhadap proses steril adalah resistensi tertinggi endospora: bakteri, Resistensi sedang: *cystprotozoa*, spora seksual fungi (*zygospora*), beberapa virus (virus tanpa kapsul lebih resisten dari pada virus berkapsul, virus paling resisten adalah hepatitis B dan poliovirus), beberapa sel vegetatif bakteri (sel paling resisten adalah *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, dan spesies *Pseudomonas*). Serta resistensi rendah sebagian besar sel *vegetative* bakteri, hifa atau spora fungi umum, virus, yeast dan tropozoit. Terdapat beberapa teknik sterilisasi yang dapat dilakukan, yaitu: sterilisasi secara fisik, kimia, mekanik, pasteurisasi dan tyndalisasi.

1. Sterilisasi secara fisik

Selama senyawa kimia yang disterilkan tidak berubah atau terurai akibat suhu tinggi dan atau tekanan tinggi, selama itu sterilisasi secara fisik dapat dilakukan. Misalnya dengan pemanasan udara panas, uap air bertekanan, pemijaran, penggunaan sinar-sinar bergelombang pendek seperti sinar X, sinar gamma, UV dan sebagainya. Sterilisasi dengan udara panas (kering) digunakan alat yaitu oven (*Hot Air*

Sterilizier). Cara ini umum digunakan untuk mensterilkan peralatan gelas. Suhu yang digunakan 170 – 180°C selama 2-3 jam.

Sterilisasi dengan uap air bertekanan, merupakan cara yang paling banyak digunakan. Alat yang dipakai adalah otoklaf, umumnya material yang disterilkan berupa medium, air dan sebagainya. Suhu yang digunakan 121°C, dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Sterilisasi dengan otoklaf merupakan cara yang paling sering digunakan karena; uap air panas dengan tekanan tinggi memperbesar kemungkinan terjadinya penetrasi uap air ke dalam sel mikroorganisme, yang menyebabkan koagulasi protein protoplasma sehingga mengakibatkan kematian sel mikroorganisme.

2. Sterilisasi secara kimia

Sterilisasi secara kimia yaitu memaparkan alat atau bahan yang mengandung mikroorganisme terhadap suatu senyawa kimia sehingga dengan suatu reaksi tertentu dapat membunuh atau menghentikan pertumbuhan mikroorganisme tersebut tanpa merusak bahan atau alat yang disterilisasi. Selain waktu sterilisasi, efektivitas suatu senyawa kimia dalam membunuh mikroorganisme dipengaruhi oleh beberapa faktor :

- Jumlah mikroorganisme. Semakin besar jumlah kontaminan maka semakin lama waktu sterilisasi.
- Keadaan populasi mikroorganisme. Seringkali kontaminan yang harus dimusnahkan bukan satu spesies, melainkan campuran bakteri, jamur, spora dan virus sehingga membutuhkan spektrum bahan antimikroba yang luas.
- Temperatur dan pH dari lingkungan.
- Konsentrasi (dosis) senyawa antimikroba.
- Cara senyawa antimikroba dalam membunuh (*mode of action*).
- Adanya pelarut, senyawa organik lain yang menginterferensi dan inhibitor seperti saliva, darah dan feces.

Senyawa kimia yang paling banyak digunakan sebagai desinfektan (senyawa yang dapat menghancurkan sel) antara lain CuSO_4 , AgNO_3 , HgCl_2 , ZnO , alkohol dan campurannya. Beberapa larutan garam

seperti NaCl (9%), KCl (11%), dan KNO₃ (10%). Basa kuat dan asam kuat dapat juga digunakan karena mampu menghidrolisis sel mikroorganisme.

Larutan KmNO₄ (1%) dan HCl (1,1%) merupakan desinfektan kuat. HgCl₂ (0,1%) banyak digunakan hanya sifatnya sangat beracun dan korosif. Khlor banyak digunakan sebagai desinfektan terutama pada tempat penyimpanan air, larutan lain yang juga dapat digunakan yaitu larutan formalin (4-20%).

Sterilisasi adalah mematikan seluruh (total) mikroorganisme yang hidup pada suatu alat atau bahan. Namun istilah desinfeksi dapat memberi kesempatan beberapa mikroorganisme dapat survive. Desinfektan adalah agen kimia yang digunakan untuk mendesinfeksi objek tidak hidup (*inanimate*) seperti permukaan benda. Terminologi sanitasi digunakan untuk mendeskripsikan kombinasi desinfeksi dan pembersihan. Proses perusakan sel yang disebabkan desinfektan dapat berupa koagulasi atau denaturasi protein karena bereaksi dengan enzim mikroorganisme. Berikut adalah jenis-jenis senyawa kimia yang bersifat desinfektan.

Alkohol; atau ethanol telah digunakan sebagai desinfektan sejak lebih dari seabad lalu. Alkohol lebih efisien dalam mematikan mikroorganisme pada konsentrasi dibawah 100%. Dengan adanya air bercampur alkohol maka denaturasi protein lebih mudah terjadi (seperti halnya uap panas lebih efisien dibanding panas kering). Konsentrasi yang sering digunakan untuk desinfektan adalah 70%. Selain mendenaturasi protein, alkohol juga dapat melarutkan lemak sehingga berpengaruh terhadap membran sel dan kapsul beberapa jenis virus. Sel vegetatif dan hifa dapat dimatikan dengan alkohol, namun spora seringkali resisten. Alkohol juga dapat digunakan sebagai pelarut desinfektan lain, seperti *iodine* yang dapat meningkatkan efektivitas desinfeksinya.

Halogen; merupakan salah satu jenis halogen adalah klorin. Klorin (*Chlorine*) efektif sebagai desinfeksi dalam bentuk gas bebas dan sebagai senyawa pelepas klorin seperti chlorite dan chloramines. Gas klorin (*compressed*) umumnya digunakan sebagai desinfektan pada pengolahan

air, kolam renang atau untuk keperluan industry. Bentuk senyawa klorin lainnya adalah Sodium hypochlorite (*bleach*) yang dapat mengoksidasi gugus sulphydryl (-SH) dan disulphide (S-S) pada protein. Seperti klotrin, hipoklorit dapat diinaktivasi dengan keberadaan materi organik. Senyawa lain yang lebih stabil yaitu chloramines yang memiliki keunggulan lebih tahan terhadap bahan organik. Chloramines juga lebih tidak beracun dan mampu melepas klorin secara perlahan sehingga memperpanjang efek bakterisidal desinfektan ini. Jenis halogen lain adalah iodine. Daya kerja iodine adalah bereaksi dengan residu tyrosin pada protein. Efek desinfeksi iodine dapat ditingkatkan dengan melarutkannya pada ethanol 70% (iodine1% +ethanol70%).

Senyawa fenol (*Phenolics*); Senyawa fenol memiliki gugus asam karboksilat yang bersifat mematikan dengan daya kerja merusak protein dan membrane. Salah satu keuntungan menggunakan senyawa fenol adalah tetap aktif walaupun terdapat senyawa organik dan detergen. Desinfektan seperti Dettol, Lysol dan Chlorhexidine adalah derivatif dari senyawa fenol. Salah satu senyawa fenol bernama Hexachlorophene sangat efektif membunuh bakteri gram positif seperti *staphylococci* atau *streptococci* sehingga digunakan sebagai salah satu bahan pembuatan sabun, deodorant dan shampo.

Surfactants; molekul surfactans atau *surface active agents* seperti sabun dan detergen memiliki kemampuan memposisikan dirinya sendiri sejajar diantara dua lapisan. Dengan sifat ini maka bahan tidak larut air akan dilingkupi oleh molekul surfactans. Sabun ataupun detergen lebih berguna untuk memfasilitasi pemindahan kotoran dan mikroorganisme dibandingkan dengan sifat desinfektannya. Pemindahan kotoran dapat terjadi karena bahan tidak larut air seperti sekret minyak pada kulit dan kotoran akan dilarutkan (*emulsifying*) pada air sehingga dapat dibasuh dan dibuang. Detergen dapat berupa anionic (bermuatan negatif), cationic (bermuatan positif) atau *non ionic*. *Detergen cationic* seperti *quaternary ammonium compounds* (senyawa ammonium kuartener) dapat melisis sel dengan kombinasi terhadap phospholipids membran sel dan merusaknya.

Ethylene oxide; pada umumnya pendedahan secara kimia seperti contoh diatas adalah hanya bersifat desinfeksi. Namun jika menggunakan gas *ethylene oxide* maka baik sel vegetatif, spora dan virus dapat dimusnahkan sehingga istilah yang digunakan adalah sterilisasi. Gasethylene oxideumumnya dipakai untuk sterilisasi peralatan kedokteran dalam jumlah dan material yang tidak tahan panas seperti plastik. sedangkan pada industri pangan gas ini digunakan sebagai zat antifungi fumigant untuk buah-buahan kering, bawang dan kacang. Bahan yang akan disterilisasi ditempatkan ke dalam wadah tertutup kemudian diisi gas dengan udara lembab pada 40-50°C selama beberapa jam. Ethylene oxide sangat mudah terbakar dan penggunaanya dapat dengan mencampurkan 10% gas ini ke dalam gas lain yang tidak mudah terbakar seperti karbondioksida. Bahan yang telah disterilisasi menggunakan gasethylene oxide harus dibasuh dengan udara segar untuk menghilangkan gas ini karena sangat bersifat toksik. Cara kerja gasethylene oxide membunuh mikroorganisme adalah dengan mendenaturasi protein dengan memindahkan hydrogen labil seperti pada gugus sulphydryl dengan hydroxyl ethyl radical.

3. Sterilisasi secara mekanik.

Beberapa media atau bahan akan mengalami perubahan karena tidak tahan terhadap pemanasan tinggi ataupun tekanan tinggi. Dengan demikian maka sterilisasi yang efektif yaitu secara mekanik misalnya, penyaringan menggunakan filter khusus. Jenis filter yang digunakan juga tergantung dari jenis medium. Beberapa filter atau saringan yaitu: *Filter Seitz*, *Filter Chamberland Pasteur* dan *Filter Berkefeld*.

Prinsip sterilisasi secara mekanik (filtrasi) yaitu menyaring suatu cairan non steril dengan kertas membran sehingga cairan yang melewatinya akan terbebas dari mikroorganisme (steril). Pada umumnya bahan yang disterilkan melalui cara ini adalah bahan yang mengandung senyawa tidak tahan suhu tinggi atau tekanan tinggi seperti serum darah, antibiotik, glukosa dll. Filter apparatus umumnya terdiri dari corong, filter base, penjepit corong, labu pengumpul, selang, dan pompa vakum. Filter apparatus juga dapat digunakan untuk menghitung mikroorganisme dengan prinsip yang sama dengan sterilisasi filtrasi. Kertas membran filter memiliki pori-pori yang sangat

kecil, lebih kecil dari ukuran bakteri pada umumnya. Diameter pori-pori dapat berukuran 0,2 μm , 0,45 μm , 0,65 μm dll.

Kertas membran yang baik adalah yang bebas dari bahan inhibitor atau stimulus pertumbuhan, bebas dari bahan yang mampu menginterferensi indikator media, tinta skala yang tidak beracun, berdiameter 47 mm, berpori maksimal 0,45 μm , minimal 70% luas area berpori. Mampu dilewati dengan *flowrate* 55 ml/menit/ cm^2 pada 25°C, diharapkan tetap mampu menyaring kultur cair 1×10^3 *Serratia marcescens*. Sedangkan ISO11133-1 (2009:8) menyarankan menggunakan filter berukuran 0,2 μm dan membasuh kertas membran setelah digunakan untuk melarutkan substansi yang tertinggal pada kertas membran seperti protein dan antibiotik.

4. Pasteurisasi.

Pasteurisasi adalah teknik sterilisasi yang biasa digunakan untuk larutan-larutan yang mudah rusak apabila terkena suhu tinggi lebih tepat digunakan untuk susu dan produk susu. Pasteurisasi tidak membunuh semua mikroorganisme yang terdapat pada susu namun mengurangnya sehingga akan lebih tahan lama disimpan. Bakteri *thermoduric* memiliki kemungkinan bertahan hidup lebih besar saat pasteurisasi. Pasteurisasi terdapat dua cara yaitu metode lama (yang dikembangkan oleh Louis Pasteur), dengan memanaskan susu pada 63°C selama 30 menit atau dengan flash pasteurisasi (HTST-*High Temperature Short-Term*) yaitu pemanasan cepat pada 72°C selama 15 detik kemudian didinginkan dengan cepat.

5. Tyndalisasi

Steaming (*tyndallization*) atau sterilisasi bertahap (*discontinue*) yang dikembangkan oleh John Tyndall adalah istilah untuk cara sterilisasi dengan uap air panas yang dapat mencapai suhu 100°C pada wadah tanpa tekanan. Sterilisasi menggunakan uap air panas dapat dilakukan sekali atau tiga kali (tahap) dengan hari yang berlainan dengan memanaskannya pada 80°C selama satu jam. Tyndalisasi dilakukan pada suhu 90-100°C selama 30 menit secara bertahap 3 kali. Selama jeda tahapan media diinkubasi pada 37°C semalam. Pemanasan tiga tahap

dimaksudkan untuk memberi kesempatan endospora untuk berkecambah sehingga akan mati pada tahap pemanasan selanjutnya.

B. Sterilisasi Ruang Kerja

Ruang kerja yang digunakan untuk pekerjaan aseptis adalah ruang steril, ruangan ini harus senantiasa bersih, dinding dan lantai bersihkan setiap pagi dengan zat anti kuman/desinfektan. Pada ruang kerja ini terdapat *Laminar Air Flow Cabinet* sebagai alat utamanya. Alat ini pun harus dalam kondisi steril. Cara melakukan teknik aseptis pada alat ini adalah sebagai berikut:

- Ruang bagian dalam *Laminar Air Flow Cabinet* disterilisasi dengan menyemprotkan alkohol 70% dengan menggunakan hand sprayer
- Permukaan *Laminar Air Flow Cabinet* di basuh menggunakan alkohol 70%
- Alat dan bahan (Erlenmeyer, cawan petri, spatula, pipet tetes, pipet ukur, skalpel, pinset, gunting dan cutter, baycline, kapas, betadine, hand sprayer berisi alkohol 70%, lampu bunsen) diletakkan di *Laminar Air Flow Cabinet* untuk disterilisasi menggunakan lampu UV selama ± 1 jam
- Sterilisasi ini mutlak dilakukan menjelang *Laminar Air Flow Cabinet* digunakan sebelum inokulasi.

Analisa mikrobiologi sangat mensyaratkan kondisi aseptis sebagai sesuatu yang mutlak dilakukan dalam setiap tahap pelaksanaannya. Hambatan utama keberhasilan pelaksanaan analisa mikrobiologi adalah kontaminasi yang dapat terjadi setiap saat baik pada saat prosedur tersebut dikerjakan ataupun selama kultivasi dalam ruang inkubator. Kontaminasi oleh berbagai mikroorganisme seperti bakteri kontaminan, jamur, yeast atau jasad renik lainnya menjadi masalah yang sangat serius, karena mikroorganisme kontaminan akan segera mengkonsumsi zat hara yang ada pada medium kultivasi serta dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang dikultivasi. Meskipun mikroorganisme ini berukuran kecil, tetapi jumlahnya sangat banyak dan aktivitas metabolismenya sangat tinggi sehingga jika dibiarkan maka dalam waktu yang relatif singkat akan mendominasi kultur yang dampaknya akan menyebabkan pertumbuhan eksplan terganggu bahkan mati. Matinya eksplan disebabkan karena hasil

metabolisme mikroorganisme yang mengkontaminasi kultur akan mengeluarkan senyawa-senyawa yang bersifat toksik bagi eksplan.

Seperti dijelaskan sebelumnya bahwa kontaminasi bisa terjadi pada setiap tahapan kultur, dan sumber kontaminasi dapat berasal dari eksplan tumbuhan, organisme kecil yang masuk ke dalam medium, alat yang tidak steril dan lingkungan kerja yang kotor sehingga prosedur aseptis yang harus dikerjakan untuk menanggulangi kontaminasi adalah :

C. Sterilisasi Medium

Media yang telah siap disterilisasi (15 Psi/1 atm, 121°C selama 15 menit) harus dibuka sedikit tutupnya (jika menggunakan wadah tutup berulir) atau harus dilubangi plastiknya supaya tekanan yang dihasilkan autoklaf dapat masuk ke dalam media. Jika hal ini tidak dilakukan maka tekanan dalam wadah lebih rendah dari *chamber* autoklaf dan menyebabkan sterilisasi menjadi tidak efisien. Jika media yang disterilisasi dengan autoklaf terdapat dalam jumlah 1 L pada erlenmeyer 2 L maka sebaiknya waktu sterilisasi diperpanjang menjadi 30 menit. Pencegahan presipitasi, pencoklatan dan pecahnya substrat pada sterilisasi menggunakan autoklaf dapat dilakukan beberapa cara pencegahan yaitu:

- Sterilisasi glukosa terpisah dengan pepton (asam amino) atau senyawa fosfat, dan sterilisasi fosfat terpisah dengan pepton atau komponen garam mineral, dan sterilisasi garam mineral terpisah dengan agar.
- Tidak melakukan sterilisasi media dengan pH >7,5 (untuk mengatasinya, sterilisasi pada pH netral kemudian diatur pH menjadi basa dengan larutan basa steril). Tidak melakukan sterilisasi larutan agar dengan pH < 6.

Dampak pemanasan terhadap komposisi media mulai sejak suhu 60°C yang berdampak pada dekomposisi *growth factor*, karamelisasi gula (reaksi Maillard antara gula dan asam amino) dan perubahan pH. Media yang mengandung karbohidrat disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 116–118°C untuk mencegah dekomposisi karbohidrat dan

pembentukan formasi senyawa toksik yang menghambat mikroorganisme. Sedangkan untuk media yang tidak tahan terhadap sterilisasi autoklaf (seperti media yang mengandung protein telur) sebaiknya disterilisasi menggunakan teknik inspisasi (*inspissation*). Cara ini dapat dilakukan dengan cara memanaskan pada Arnold steam *sterilizer* dengan suhu 75°–80°C selama 2 jam dan dilakukan pada tiga hari yang berurutan (jeda hari ditujukan untuk memberikan kesempatan mikroorganisme kontaminan untuk berkecambah). Bahan yang *heat-labile* seperti larutan antibiotik, vitamin atau karbohidrat disterilisasi menggunakan teknik membran filter yang kemudian ditambahkan ke dalam media setelah didinginkan sampai 50°C.

D. Bekerja Tanpa Kontaminasi (Dasar Teknik Aseptis)

Teknik aseptis atau steril adalah suatu sistem cara bekerja (praktek) yang menjaga sterilitas ketika menangani pengkulturan Mikroorganisme untuk mencegah kontaminasi terhadap kultur mikroorganisme yang diinginkan. Dasar digunakannya teknik aseptik adalah adanya banyak partikel debu yang mengandung mikroorganisme (bakteri atau spora) yang mungkin dapat masuk ke dalam cawan, mulut erlenmeyer, atau mengendap di area kerja. Pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan ini dapat mempengaruhi atau mengganggu hasil dari suatu percobaan. Mikroorganisme dapat juga "jatuh" dari tangan operator, sarung tangan atau jas laboratorium karena pergerakan lengan yang relatif cepat. Penggunaan teknik aseptik meminimalisir material yang digunakan terhadap agen pengontaminasi. Pada kenyataanya teknik aseptis tidak dapat melindungi secara sempurna dari bahaya kontaminan. Namun semakin banyak belajar dari pengalaman maka semakin mengurangi resiko yang ditimbulkan.

Teknik aseptis digunakan pada saat: Teknik aseptis seharusnya digunakan saat kita bekerja dengan mikroorganisme hidup dan dengan segala media pertumbuhannya. Teknik aseptis sebaiknya digunakan ketika kita tidak ingin larutan dari suatu botol tidak berubah sifat akibat aktivitas mikroorganisme, seperti saat membuat buffer meskipun buffer dengan konsentrasi garam tinggi atau mengandung deterjen.

Teknik aseptis disarankan pada saat kita bekerja menggunakan agen atau senyawa yang berbahaya seperti bahan kimia beracun atau bahan radioaktif. Tentu saja perlindungan diri sendiri dari bahaya senyawa ini lebih penting. Beberapa contoh:

- Mentransfer biakan dari media satu ke media lainnya. Bakteri kontaminan yang tumbuh tentu saja dapat mengganggu kemurnian biakan dan mungkin saja membuat rancu hasil yang didapatkan.
- Memfilter media atau serum dan menghitung jumlah bakteri dengan cara filtrasi. Kontaminasi yang ikut tersaring dapat tumbuh pada media baru yang membuat tidak terpakainya media pertumbuhan tersebut atau mempengaruhi jumlah total bakteri.
- Membuka dan merehidrasi bakteri terliofilisasi. Teknik aseptis dapat menjaga sel yang terrehidrasi dari bakteri kontaminan dan menjaga tidak keluarnya sel ke meja kerja.
- Melakukan reaksi restriksi atau PCR. Walaupun enzim restriksi pada umumnya disimpan dalam gliserol 50% (bakteriostatik) tapi enzim yang diencerkan akan lebih rentan rusak akibat aktivitas mikroorganisme atau dihambat oleh ion atau unsur tertentu. Kontaminasi DNA asing yang masuk ke dalam tube PCR mungkin dapat teramplifikasi sehingga hasil yang didapat membingungkan.
- Melabeli sel dengan (32P) fosfat. Pada kasus ini kerja aseptis ditujukan untuk melindungi operator dari bahan kimia berbahaya. Jika menggunakan teknik aseptis maka Anda tidak akan membiarkan tutup bahan radioaktif terbuka atau secara tidak sengaja menggunakan pipet bekas bahan radioaktif.

Beberapa aturan umum teknik aseptis:

- Meja kerja sebaiknya jauh dari sesuatu yang dapat menciptakan aliran udara, misalnya tidak ada jendela yang terbuka, tidak dekat dengan pintu yang selalu dibuka-tutup dan jauh dari lalu-lintas orang. Penggunaan kabinet biosafety dapat menjaga dan mengatur aliran udara tetapi ini bukan merupakan suatu jaminan mutlak dari resiko terkontaminasi.

- Pastikan meja kerja bersih dari kotoran dan benda-benda yang tidak akan digunakan. Kultur tua atau pipet bekas seharusnya tidak berada di meja kerja. Kotoran seringkali sulit dibersihkan pada sudut-sudut ruang.
- Usap meja kerja dengan antiseptik atau senyawa pembersih lain sebelum digunakan. Di sebagian besar laboratorium umumnya menggunakan etanol 70% untuk membersihkannya. Sediakan etanol pada posisi selalu dekat dengan meja. Jika telah selesai bekerja, sebaiknya meja kerja dikosongkan dari peralatan dan bersihkan lagi.
- Semua peralatan (pipet, cawan dll.) yang digunakan harus steril. Sebaiknya semua peralatan yang telah disterilisasi diberi label. Jika menemukan alat yang sepertinya telah disterilasi tapi masih ragu terhadap sterilitasnya maka sebaiknya jangan digunakan. Bungkus peralatan baik alat steril sekali pakai atau bukan (pipet, syringe dll.) diperiksa terlebih dahulu apakah terdapat kebocoran atau tersobek.
- Atur peralatan di meja kerja sedemikian rupa sehingga meminimalisir pergerakan tangan. Alat-alat yang biasanya digunakan dengan tangan kanan (jarum inokulum, filler, pipet dll.) letakkan disebelah kanan begitu juga sebaliknya (rak tabung, cawan petri, erlenmeyer dll.) terkecuali untuk tangan kidal. Di bagian tengah meja kerja disediakan ruang lapang untuk bekerja.
- Membakar mulut atau bagian tepi dari suatu alat dapat membunuh mikroorganisme yang menempel.
- Telah siap dengan segala peralatan dan bahan yang dibutuhkan. Semua bahan dan alat untuk prosedur tertentu telah dipersiapkan di meja kerja. Jangan sampai meninggalkan meja kerja untuk mengambil sesuatu yang terlupa atau tertinggal. Perhitungkan semua yang diperlukan beserta cadangannya.
- Pakai sarung tangan lateks dan ganti secara berkala. Sarung tangan membantu melindungi dari tumpahan biakan atau bahan kimia berbahaya. Tidak menggunakan sarung tangan dirasa tidak bermasalah jika materi dan bakteri yang diteliti dipastikan tidak berbahaya.

- Cuci tangan sebelum dan sesudah bekerja. Cuci tangan dengan desinfektan atau sabun bila tidak ada desinfektan. Cuci tangan dapat membilas mikroorganisme yang ada di tangan.

Saran-saran teknik aseptis:

- Minimalisasi gerak: pergerakan tangan dapat menciptakan aliran udara . semakin cepat pergerakannya semakin cepat aliran udara yang ditimbulkan. Pergerakan lengan sebaiknya dilakukan seperlu mungkin dan bergerak secara lembut.
- Minimalisasi jarak: jarak antar peralatan diatur seefektif dan seefisien mungkin. Antar peralatan jangan diletakkan terlalu jauh.
- Minimalisasi keterpaparan : semakin sering menggerakkan sesuatu (mis: cawan berisi media) melewati udara maka semakin besar partikel udara untuk masuk. Semakin lama tutup erlenmeyer terbuka juga semakin besar terkontaminasi.

Catatan penting dalam kerja aseptis:

- Tutup erlenmeyer, botol atau cawan dibuka $\pm 45^\circ$. Tujuannya untuk meminimalisasi udara masuk namun masih dapat mentransfer sesuatu.
- Jika diharuskan untuk membuka penuh dan tutup diletakkan di meja kerja, maka tutup dapat diletakkan tertelungkup atau terlentang (muka menghadap ke atas). Jika tertelungkup pastikan permukaannya bersih dan bila terlentang pastikan juga tidak ada gerakan di atasnya.
- Untuk menghindari bakteri yang menempel pada jarum inokulum terpenal/terciprat maka diameter loops harus berkisar 2-3 mm, untuk memperkecil getaran panjang kawat tidak lebih dari 6 cm.
- Tidak boleh menyedot cairan pada saat pipeting dengan mulut.
- Untuk menghindari penyebaran mikroorganisme dari tetesan pipet yang terjatuh maka dapat digunakan kain steril yang diberi desinfektan sebagai alas. Kain ini setelah selesai dibuang sebagai limbah berbahaya.

Terminologi:

- Antiseptik: bahan kimia yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme.
- Asepsis: pencegahan kepada mikroorganisme pengontaminasi dengan membunuh, memindahkan atau mencegah masuknya mikroorganisme terhadap bahan steril.
- Bakterisida: bahan kimia atau fisika yang dapat membunuh sel vegetatif (*non-spore forming*) bakteri.
- Bakteriostatik: bahan kimia yang dapat mencegah pertumbuhan (multiplikasi) bakteri.
- Kontaminasi: introduksi atau pemaparan mikroorganisme terhadap bahan steril.
- Desinfektan: bahan kimia yang diperuntukkan membunuh, memindahkan mikroorganisme patogen kecuali spora bakteri.
- Steril: bebas dari mikroorganisme
- Sterilisasi: pembebasan suatu benda dari segala jenis kehidupan.

BAB IV MEDIA DALAM ANALISA MIKROBIOLOGI

A. Pengertian dan fungsi media

Medium (jamak: media) ialah substrat yang terdiri atas campuran nutrisi yang diperlukan Mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi yang disediakan dari media berupa molekul-molekul yang selanjutnya dirakit untuk menyusun komponen sel dan memperbanyak diri sehingga sel-sel tersebut dapat dimanfaatkan. Dengan adanya media pertumbuhan dapat dilakukan isolasi mikroorganisme menjadi kultur tunggal dan juga memanipulasi mikroorganisme yang didapatkan untuk kepentingan tertentu. kultur media merupakan substansi dengan kadar tertentu dalam bentuk cair, setengah padat atau padat yang mengandung bahan alami dan atau buatan untuk mendukung perkembangbiakan mikroorganisme.

Mikroorganisme sama dengan organisme pada umumnya yaitu untuk kelangsungan hidupnya membutuhkan nutrisi untuk pertumbuhan, sintesis sel, keperluan energi dalam metabolisme, dan pergerakan. Nutrisi tersebut dapat diperoleh dari media. Umumnya media mengandung air, sumber energi, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen, hidrogen serta unsur kelumit (trace mineral). Media ini dapat pula ditambahkan faktor pertumbuhan berupa asam amino, vitamin atau nukleosida.

B. Nama-nama media

Media pertumbuhan memiliki banyak nama yang umumnya mengacu kepada nama asli sesuai literatur. Terdapat juga media dengan komposisi yang sama tetapi memiliki nama yang berbeda karena diproduksi oleh perusahaan yang berbeda. Misalnya *Trypticase™ Soy Agar* diproduksi oleh BBL (BD Diagnostic Systems), *Tryptone Soy Agar* diproduksi oleh Oxoid Unipath, dan *Tryptic Soy Agar produced* diproduksi

Difco (BD *Diagnostic Systems*) yang semuanya memiliki komposisi yang sama. Banyak media juga dikenal sebagai akronim, misalnya TSA adalah singkatan dari *Trypticase™ Soy Agar*. Jika seseorang memodifikasi komposisi media yang telah ada (memiliki nama asli), maka istilah “*modified*” diletakkan setelah nama media. Misalnya *TSA modified* bukan *Modified TSA*. Media yang tidak memiliki nama formal umumnya dinamai berdasarkan organisme yang ditargetkan, misalnya *Bacillus stearothermophilus Broth*.

C. Bahan-bahan media pertumbuhan

1. *Sumber nutrisi atau zat makanan*

Analisa dari komposisi kandungan unsur sel mikroorganisme menunjukkan lebih dari 95% dari berat kering terdiri dari unsur utama (*major elements*) yaitu unsur C, O, H, N, S, P, K, Na, Ca, Mg, dan Fe. Jika suatu jenis mikroorganisme ingin ditumbuhkan dalam cawan petri atau tabung maka harus dipenuhi kebutuhan unsur tersebut dari molekul organik yang terdapat pada media. Komposisi setiap bahan pada media tertentu terhadap mikroorganisme target menggambarkan kondisi nutrisi pada habitat aslinya karena pada keadaan itulah mikroorganisme tersebut optimal tumbuh. Berikut adalah sumber nutrisi media.

Sumber karbon; molekul organik umumnya mengandung karbon sebagai tulang punggungnya seperti karbohidrat, lemak, protein yang terdapat pada pepton, glukosa, dll. Bahan organik inilah yang menjadi sumber karbon utama untuk mikroorganisme heterotrof yang umum dikultivasi.

Sumber nitrogen; sumber nitrogen mencakup asam amino, protein atau senyawa bernitrogen lain yang terkandung pada peptone, meat extract, atau tryptose. Sejumlah mikroorganisme juga dapat menggunakan sumber N anorganik seperti urea.

Sumber oksigen; untuk mikroorganisme heterotrof yang dikulturkan pada cawan, sebagian besar oksigen didapatkan langsung dari udara sedangkan mikroorganisme yang dikultur pada media cair sumber

oksigen berasal dari oksigen yang terlarut air. Oleh karena itu aerasi pada kultur cair dapat meningkatkan pasokan oksigen kepada mikroorganisme.

Sumber fosfat; sumber fosfat organik seperti beberapa protein, kofaktor atau ATP yang dapat dijumpai pada bahan *yeast extract* atau pepton. Namun hampir semua mikroorganisme dapat memanfaatkan fosfat anorganik yang ditambahkan langsung pada media seperti *potassium phosphate*, *sodium phosphate* dll.

Sumber unsur sekelumit (*mikronutrient/trace element*); pada lingkup media pada cawan petri, unsur mikronutrien (Zn, Mn, Mo, Ni, Co, Cu dll.) dapat diperoleh dari akuades atau peralatan gelas. Fungsi mikronutrien ini umumnya menjadi bagian dari enzim atau kofaktor untuk menjadi katalis reaksi atau menjaga struktur protein. Oleh karena itu pembuktian kebutuhan unsur mikronutrien sangat sulit dilakukan dalam skala laboratorium karena setiap jenis mikroorganisme membutuhkannya dalam jumlah yang sangat sedikit .

2. Komposisi media pertumbuhan

Formulasi media pertumbuhan prinsipnya hampir sama dengan resep masakan di dapur yang setiap bahan bakunya diatur dengan takaran tertentu. Berikut adalah beberapa bahan-bahan yang umum dipakai dalam pembuatan media pertumbuhan.

Agar; adalah bahan yang paling umum digunakan sebagai *gelling agent* pada media yang terbuat dari ekstrak alga. Agar bukan sebagai sumber nutrisi bagi mikroorganisme namun fungsinya lebih bersifat mekanis yaitu memadatkan media cair sehingga sel tidak larut dalam cairan. Struktur agar terdiri dari *D-galactose*, *3,6-anhydro-L-galactose*, dan *D-glucuronic acid*. Umumnya agar terbuat dari ganggang merah. Agar cocok menjadi agen pematat karena setelah dilarutkan pada suhu mendidih dapat didinginkan sampai 40-42°C sebelum memadat dan tidak akan mencair lagi sebelum suhu mencapai 80-90°C. Pencairan dan pemadatan berkali-kali atau sterilisasi yang terlalu lama dapat menurunkan kekuatan agar, terutama pada pH yang asam.

Peptone; adalah hasil hidrolisis protein yang dibentuk dari proses enzimatis atau digesti asam. Casein banyak digunakan sebagai substrat pembentuk peptone, tetapi beberapa bahan lain seperti soy bean meal juga sering digunakan.

Meat/ plant extract; ekstrak daging dan tumbuhan mengandung asam amino, peptida dengan berat molekul rendah, karbohidrat, vitamin, mineral dan trace metals. Ekstrak jaringan hewan mengandung lebih banyak bahan protein larut air dan glikogen sedangkan ekstrak tumbuhan lebih banyak terdapat karbohidrat di dalamnya.

Faktor tumbuh; banyak mikroorganisme yang membutuhkan faktor tumbuh spesifik yang harus ada dalam media pertumbuhannya. Beberapa diantaranya adalah vitamin, asam amino, asam lemak dan nutrisi dari darah.

Komponen selektif; suatu bahan yang berfungsi untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme non target disebut komponen selektif. Komponen selektif dipakai pada media selektif yang berguna untuk mengisolasi bakteri spesifik dari populasi campuran. *Bile salts* (garam empedu), selenite, tetra-hionate, tellurite, azide, phenylethanol, sodium lauryl sulfate, sodium chloride (konsentrasi tinggi), dan beberapa pewarna (eosin, Crystal Violet, dan Methylene Blue) umumnya dipakai sebagai bahan selektif. Bahan antimikroba juga dapat digunakan untuk menekan pertumbuhan bakteri tertentu, diantaranya adalah ampicillin, chloramphenicol, colistin, cycloheximide, gentamicin, kanamycin, nalidixic acid, sulfadiazine, dan vancomycin.

Komponen diferensial; berbeda dengan komponen selektif, komponen diferensial ini tidak menekan pertumbuhan mikroorganisme tertentu namun sebagai bahan untuk memudahkan pembedaan mikroorganisme target dari populasi campurannya (deteksi visual). Bahan diferensial seperti pH indikator akan membuat koloni target berbeda warna karena memproduksi asam. Bahan lainnya berupa pewarna kromogenik yang mampu berubah warna jika suatu reaksi enzim spesifik terjadi.

pH buffer/ buffer salts; pH buffer digunakan untuk menjaga pH media selama digunakan untuk tumbuh karena beberapa mikroorganisme akan tumbuh optimal pada kisaran pH yang spesifik.

D. Macam-macam media pertumbuhan

1. Berdasarkan sifat fisik/konsistensi

Medium padat/ Solid media; yaitu media yang mengandung agar 15 g/L sehingga setelah dingin media menjadi padat. Media padat berguna untuk menjaga sel tidak berpindah tempat sehingga akan mudah dihitung dan dipisahkan jenisnya ketika tumbuh menjadi koloni. Media padat juga menampakkan difusi hasil metabolit bakteri sehingga memudahkan dalam pengujian suatu hasil metabolit.

Medium cair/Liquid media; yaitu media yang tidak mengandung agar, contohnya adalah NB (Nutrient Broth), LB (Lactose Broth). Medium cair akan memberi kesempatan bakteri untuk menyebar dan tercampur dengan seluruh nutrisi sehingga lebih cocok untuk mengoptimalkan pertumbuhan mikroorganisme. Dapat juga untuk mengetahui karakter suatu mikroorganisme berdasarkan kebutuhan oksigen.

Medium setengah padat/Semisolid media; yaitu media yang mengandung agar 0,3-0,4% sehingga menjadi sedikit kenyal, tidak padat dan tidak begitu cair. Media semi solid dibuat dengan tujuan supaya pertumbuhan mikroorganisme dapat menyebar ke seluruh media tetapi tidak mengalami pencampuran sempurna jika tergoyang. Misalnya bakteri yang tumbuh pada media NFB (Nitrogen free Bromthymol Blue) semisolid akan membentuk cincin hijau kebiruan di bawah permukaan media, jika media ini cair maka cincin ini dapat dengan mudah hancur. Semisolid juga bertujuan untuk mencegah/menekan difusi oksigen, misalnya pada media Nitrate Broth, kondisi anaerob atau sedikit oksigen meningkatkan metabolisme nitrat tetapi bakteri ini juga diharuskan tumbuh merata di seluruh media.

2. Berdasarkan komposisi bahan

Media sintetik/ media terdefinisi (*synthetic/ defined media*); adalah media yang seluruh komposisinya diketahui. Media sintetik digunakan dalam penelitian mengenai uji metabolisme suatu mikroorganisme. Banyak jenis mikroorganisme kemoorganotrof heterotrof dapat tumbuh pada media sintetik dengan glukosa sebagai sumber karbon dan ammonium salt sebagai sumber nitrogen. Berikut contoh komposisi media sintetik: Medium for Cyanobacteria (g/liter) yang komposisinya adalah: Agar 10.0g, NaNO_3 1.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075g, H_2PO_4 0.04g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.036g, Na_2CO_3 0.02g, Citric acid 6.0 mg, Ferric ammonium citrate 6.0 mg, EDTA disodium salt 1.0 mg, *Trace metal mix* A 51.0 mL,

Media kompleks (*complex media*); adalah media yang sebagian komposisinya tidak diketahui dengan pasti. Media kompleks seringkali dibutuhkan karena kebutuhan nutrisi dari beberapa bakteri tidak diketahui sehingga media sintetik tidak dapat dibuat untuk keperluan ini. Seringkali satu jenis media kompleks dapat cukup kaya untuk memenuhi kebutuhan banyak jenis bakteri. media ini dapat mengandung bahan yang tidak diketahui pasti komposisinya seperti peptone, meat extract dan yeast extract. Contoh media kompleks adalah nutrient broth, tryptic soy broth dan MacConkey agar.

3. Berdasarkan tujuan

Media isolasi; adalah media umum yang digunakan untuk mengisolasi suatu mikroorganisme menjadi kultur murni. Biasanya mengandung semua kebutuhan untuk tumbuh, misalnya Blood agar atau Chocolate agar.

Media selektif (*selective or inhibitory media*); berfungsi untuk menumbuhkan mikroorganisme target/ yang diinginkan dan menekan pertumbuhan mikroorganisme yang tidak diinginkan (background flora). Umumnya media selektif menyeleksi mikroorganisme target berdasarkan kelompok, genus atau spesiesnya, misalnya EMB agar untuk menyeleksi *E. coli*, Baird parker untuk isolasi *S. aureus*.

Media pengkaya (*enrichment media*); termasuk media selektif namun lebih berfungsi untuk memperbanyak mikroorganisme target sehingga saat dilakukan pengkulturan, mikroorganisme yang tidak diinginkan tidak dalam jumlah besar. Media pengkaya harus dalam bentuk cair dan digunakan di awal tahap analisa.

Media peremajaan kultur (*maintenance of cultures*); Media ini seharusnya tidak begitu kaya nutrisi sehingga mempercepat pertumbuhan, misalnya Nutrient agar.

Media untuk penentuan kebutuhan nutrisi/ kemampuan penggunaan substrat; media ini berfungsi untuk mendeteksi dan mengidentifikasi kebutuhan suatu substrat dari bakteri (yang tidak diketahui kebutuhan nutrisinya) dengan menghilangkan atau mensubstitusi komponen suatu substrat. Media ini tidak digunakan untuk kebutuhan sehari-hari namun lebih untuk keperluan penelitian. Sebagai contoh sederhananya adalah Koser Citrate untuk mendeteksi penggunaan citrate sebagai sumber karbon tunggal.

Media untuk karakterisasi bakteri; umumnya mengandung nutrisi yang cukup untuk pertumbuhan dan ditambah substrat yang akan diuji penggunaannya. Reagen atau indikator tertentu dapat juga ditambahkan untuk mengetahui hasil reaksi.

Media skrining (*screening media*); media ini diperuntukkan untuk menggambarkan sekilas reaksi yang diperoleh dari beberapa substrat seperti produksi H₂S pada TSI oleh *enterobacteria*.

Media uji mikrobiologi untuk vitamin, asam amino dan antibiotik; media ini memerlukan pengontrolan ketat pada saat preparasinya untuk memastikan kemurniannya. Penggunaan cawan kotor dimungkinkan akan menyediakan nutrisi sehingga hasil uji menjadi rancu. Sedangkan media untuk uji antibiotik tidak begitu membutuhkan kepastian kemurnian media karena nutrisi asing tidak berpengaruh kepada hasil uji.

Media dasar tanpa nutrisi (*non-nutrient basal media*); berfungsi untuk berbagai keperluan pendukung pertumbuhan mikroorganisme seperti pelapisan Chitin agar menggunakan media chitin yang dilarutkan pada Salt agar.

E. Hal-hal penting dalam pembuatan media

1. Bahan baku air

Air yang digunakan sebagai bahan baku pembuatan media dapat memakai air destilasi. Konduktivitas air yang digunakan sebaiknya tidak lebih dari 25 $\mu\text{S}/\text{cm}$ pada 25°C dan mengandung kontaminasi mikroorganisme tidak lebih dari 1000 CFU/ml dan akan lebih baik jika menggunakan air berkonsentrasi mikroorganisme dibawah 100 CFU/ml.

2. Penimbangan media pertumbuhan

Penimbangan sebaiknya dilakukan pada timbangan analitik dengan ketelitian 0,1 g dengan kapasitas ≥ 2000 g. Penimbangan tidak perlu dilakukan secara aseptis namun tetap dalam keadaan bersih. Penimbangan secara aseptis sebaiknya dilakukan pada medium yang tidak diperbolehkan untuk diautoklaf. Untuk mencegah tercampurnya media dalam wadahnya dengan bahan lain maka sebaiknya menggunakan spatula yang berlainan.

3. Konsentrasi agar dan proses pelarutan agar

Konsentrasi agar 15.0 g/L umumnya digunakan untuk membuat media padat. Konsentrasi yang lebih rendah (7,5–10.0 g/L) dipakai untuk membuat soft agars atau media semisolid. Agar larut pada suhu 84°C dan memadat pada 38°C. Konsentrasi agar yang lebih dari ketentuan mengakibatkan proses pemadatan lebih cepat pada saat penuangan. Proses pelarutan agar dapat menggunakan *hotplate* dan *magnetic stirrer*. Indikasi larutnya agar umumnya ditunjukkan dengan beningnya media atau mencairnya serbuk agar yang tertempel pada dinding erlenmeyer. Sebaiknya pada saat pelarutan hindari panas berlebihan. *Overheating* mengakibatkan sebagian media menjadi buih

dan akan mendesak keluar dari mulut wadah dan juga membuat kerak pada dasarnya.

4. Ketebalan agar dan luas cawan yang digunakan

Media agar yang sangat tipis ketebalannya masih memungkinkan mikroorganisme untuk tumbuh (yang mungkin akan berpengaruh kepada ukuran koloni) dan nutrisi media yang tipis masih cukup memenuhi kebutuhan. Namun ketebalan media lebih mempengaruhi faktor teknis dalam penanaman seperti ketahanan agar saat menerima tekanan spreader atau saat di goresloop dan kehilangan air karena menguap. Namun sebaliknya media padat yang terlalu tebal tentu sangat memboroskan. Volume yang cukup untuk cawan petri diameter 9 cm adalah antara 12-15 ml media.

5. Pengaturan pH

pH sebaiknya diukur sebelum sterilisasi pada suhu 25°C sesuai ketentuan pH menggunakan pH meter. Sehingga setelah proses sterilisasi media akan memiliki pH sesuai persyaratan ($\pm 0,2$ pH unit). Jika pengaturan pH diperlukan maka dapat diatur dengan larutan steril sodium hydroxide (NaOH) 40 g/l atau hydrochloric acid (HCl) 36,5 g/l. Setelah disterilisasi pH sebaiknya dicek kembali dengan sedikit menuang sampel media steril.

6. Pencairan kembali media agar

Pencairan kembali media agar steril dapat dilakukan pada waterbath suhu 47-50°C dengan waktu minimal supaya untuk menjaga kualitas media. Sebaiknya tidak overheating, angkat segera setelah semuanya mencair dan digunakan tidak melebihi waktu simpan 4 jam .

7. Penuangan media ke dalam cawan atau tabung

Keseragaman volume sangat dibutuhkan dalam pendistribusian media untuk memenuhi spesifikasi metode yang dipakai. Untuk media cair yang dituang ke tabung-tabung maka sebaiknya volume yang dipindahkan lebih besar dari pada volume yang dipersyaratkan. Proses sterilisasi dapat mengurangi volume media sebesar 0,1-0,3 ml sehingga

diperlukan penakaran lebih dari yang dipersyaratkan. Misalnya peptone diluents yang menurut metode tertentu memiliki spesifikasi volume $9 \pm 0,2$ ml maka sebaiknya pipet diatur pada 9,2 ml sehingga setelah disterilisasi volume akhir masuk dalam kisaran spesifikasi.

Keseragaman penuangan volume yang sama pada cawan petri dapat diperoleh dengan cara memasukkan media padat yang telah larut ke dalam tabung-tabung sebelum disterilisasi sesuai volume yang dibutuhkan. Kemudian media steril dalam tabung (sebelum agar memadat) disebarkan ke setiap cawan (Prescott & Harley, 2002:78). Cara lainnya adalah menggunakan media dispenser (glass repeating dispenser) seperti yang telah dijelaskan pada Bab Pengenalan Alat. Terkadang demi waktu dan efisiensi, banyak praktisi yang langsung menuang media padat dari botol atau erlenmeyer langsung ke dalam cawan yang tentu saja membutuhkan keahlian dan ketepatan intuisi dalam membaginya.

Penuangan media sebaiknya tidak dilakukan dalam keadaan panas $>50^{\circ}\text{C}$ supaya tidak terjadi kondensasi berlebihan pada tutup cawan. Untuk mencegah kondensasi maka media siap tuang didinginkan (dijaga) pada suhu 50°C selama 30 menit kemudian dituang. Pembakaran mulut tabung/Erlenmeyer sebaiknya dilakukan untuk mencegah kontaminasi.

Pengeringan media cawan yang telah dituang dapat dilakukan dengan membuka tutup cawan pada LAF dan bagian permukaan media menghadap ke bawah supaya kondensasi air yang berada pada cawan petri hilang. atau keringkan pada oven dengan suhu $25-59^{\circ}\text{C}$. Pengeringan sebaiknya dilakukan jangan terlalu lama, overdrying mengakibatkan media menjadi retak-retak.

8. Pemyimpanan media jadi

Media jadi pada cawan yang telah siap pakai sebaiknya disimpan dengan posisi terbalik dan ditumpuk tidak lebih dari tiga cawan atau dapat menggunakan petri plate storage holder. Media pertumbuhan sebaiknya digunakan fresh setelah dibuat, tetapi adakalanya dibutuhkan

persiapan yang membuat media pertumbuhan yang sudah jadi harus disimpan.

Waktu penyimpanan media jadi sangat beragam. Media jadi disimpan pada suhu $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ dan disarankan untuk disimpan tidak melebihi 2-4 minggu untuk media cawan dan 3-6 bulan untuk media cair. Media yang ditambah suplemen sebaiknya dipakai pada hari yang sama saat pembuatan.

Terdapat juga bahan dapat berubah menjadi beracun ketika terpapar cahaya seperti beberapa pewarna (dye). Dengan alasan inilah terdapat petunjuk penyimpanan media pada keadaan gelap (Corry et al., 2003:388). Media jadi sebaiknya disimpan dalam suatu kemasan yang berguna untuk meminimalisasi kehilangan air dalam media agar, melindungi dari cahaya dan juga melindungi dari kontaminasi. Secara umum plastik tahan panas cocok untuk membungkus media cawan (tidak peka cahaya) yang telah jadi. Pada keadaan terbungkus inilah media dapat disimpan atau dipindahkan keluar dari kondisi aseptis. Media padat yang disimpan terlalu lama pada suhu ruang akan kehilangan kadar airnya sehingga media semakin mengeras, menipis, pecah-pecah dan jika kehilangan semua air maka akan menjadi kerak di cawan petri. Penyimpanan pada suhu refrigerator lebih dapat mempertahankan kandungan air dalam media agar. Pengecekan sterilitas media dapat mengacu kepada tabel *sterility testing* untuk menguji kualitas media sebagaimana berikut:

Tabel 2. Sterility testing kualitas media

Suhu uji/penyimpanan inkubasi	Waktu minimum uji sterilitas
4-8 °C	10-14 hari
20-25 °C	2-5 hari
35-37 °C	48-72 am

9. Perlakuan untuk media kultivasi anaerob

Optimalisasi pertumbuhan mikroorganisme anaerob obligat dapat dilakukan dengan menurunkan potensial redoks (Eh) media sebelum diinokulasikan. Reduksi ini dapat dilakukan saat preparasi media, kondisi ini dijaga pada saat penyimpanan dan sebisa mungkin saat inokulasi. Teknik khusus ini dinamakan *pre-reduced anaerobically sterilized* (PRAS) yaitu dengan cara:

- Menghilangkan oksigen terlarut dengan memanaskan hingga mendidih.
- Menambahkan cystein
- Flushing dengan gas bebas oksigen dan menyimpannya pada wadah dengan gas bebas oksigen.

Media ini sebaiknya mengandung indikator Eh yaitu resazurin yang akan berubah menjadi tidak berwarna ketika tereduksi. Jika oksidasi terjadi maka media berubah menjadi pink yang menandakan bahwa media sebaiknya tidak dipakai. Cystein juga dapat menghambat beberapa enzim proteolitik, oleh karena itu jangan menambahkan cystein jika akan melakukan uji mengenai enzim tersebut.

Tabel 3. Troubleshooting kesalahan dalam pembuatan media

Masalah	Kemungkinan kesalahan
Agar tidak memadat	overheating selama preparasi pH rendah yang menyebabkan terjadinya hidrolisis kesalahan penimbangan agar agar tidak larut sempurna komposisi tidak diaduk dengan rata
pH tidak sesuai	overheating selama preparasi kualitas air yang rendah kontaminasi larutan kimia lain pengukuran pH tidak pada suhu yang disarankan kesalahan pada pH meter buruknya kualitas medium
Warna tidak normal	overheating selama preparasi kualitas air yang rendah kesalahan pengukuran pH kontaminasi larutan kimia lain buruknya kualitas medium
Terbentuknya presipitat / endapan	overheating selama preparasi kualitas air yang rendah kesalahan pengukuran pH kontaminasi larutan kimia lain buruknya kualitas medium
Produktivitas yang rendah	kesalahan pada penimbangan atau penambahan suplemen residu senyawa toksik pada alat gelas atau air overheating selama preparasi buruknya kualitas medium kualitas air yang rendah
Selektivitas yang rendah	kesalahan penambahan suplemen suplemen terkontaminasi kesalahan penimbangan buruknya kualitas medium overheating selama preparasi
kontaminasi	kesalahan sterilisasi kesalahan teknik aseptis suplemen terkontaminasi

F. Penanganan commercial dehydrated media

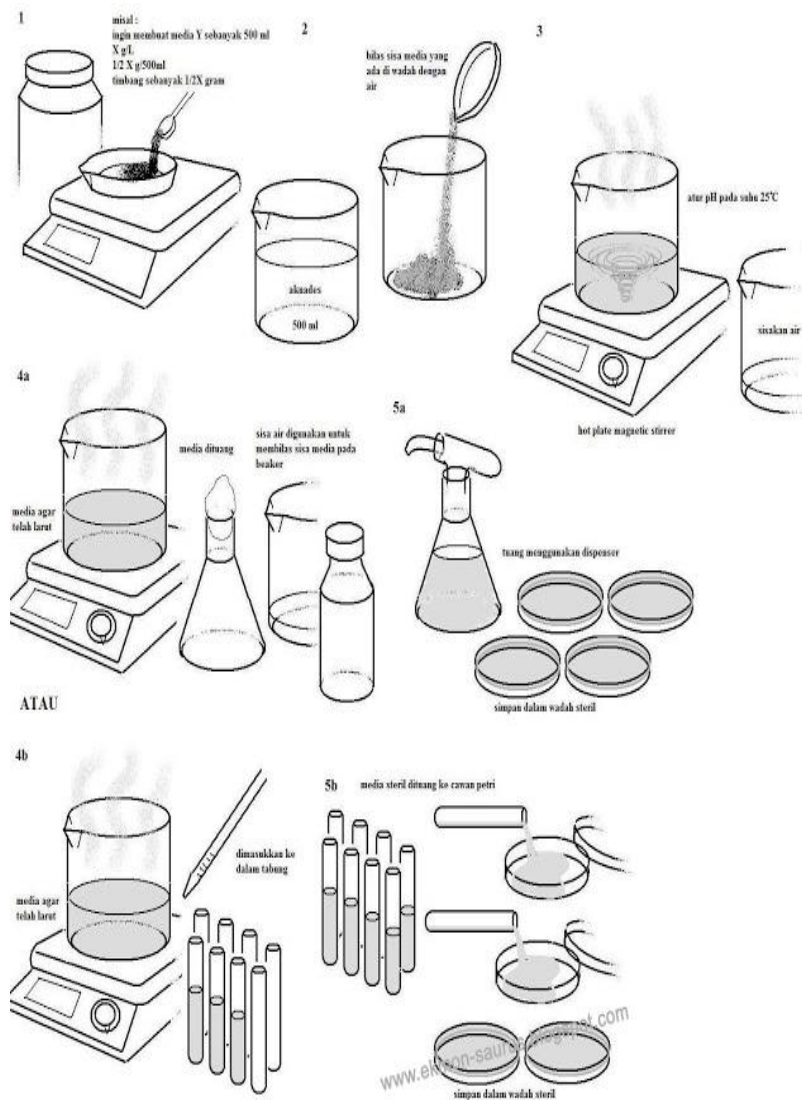
Commercial dehydrated media adalah sebutan untuk media hasil produksi suatu perusahaan yang komposisinya telah diracikkan sesuai takaran literatur lalu dihilangkan kandungan airnya supaya bertahan lama dan didistribusikan secara komersial. Dehydrated media biasanya ditempatkan dalam container berpenutup ulir dan suplemen atau bahan selektif disediakan dalam bentuk cair atau padatan. Kualitas media setelah dibuka sangat tergantung pada kondisi penyimpanannya. Lebih baik media disimpan pada suhu dingin dan jauh dari sinar (terdapat petunjuk detail pada package). Penurunan kualitas media dapat dilihat dengan adanya perubahan karakteristik bubuk media atau perubahan warna media. Sebaiknya perlu dicatat mengenai tanggal penerimaan media dan tanggal pembukaan media. Keuntungan penggunaan dehydrated media adalah:

- Mudah dalam preparasinya dan tanpa pengaturan pH.
- Setiap batch yang dibuat akan menghasilkan konsentrasi yang seragam.
- Dapat digunakan untuk pembuatan dengan volume kecil (hal yang sangat sulit jika membuat media racikan dalam volume kecil).
- Penghematan waktu dan biaya.

Sedangkan kekurangannya adalah

- Umumnya memiliki sifat higroskopis.
- Dehydrated media tidak cocok untuk jenis media yang mengandung darah atau bahan termolabil lain.

G. Ilustrasi Pembuatan Medium



Gambar 3. Ilustrasi pembuatan media

Contoh beberapa medium dalam analisa Mikrobiologi

Untuk kepentingan analisis dalam mikrobiologi, beberapa macam medium yang digunakan tergantung tujuan analisis yang dilakukan, diantaranya:

➤ **PCA (*Plate Count Agar*)**

Tripton	5 g
Yeast ekstrak	1,5 g
Dekstroza	1 g
Agar	15 g
Aquades	1000 ml
pH	7,0

➤ **NA (*Nutrien Agar*)**

Ekstrak daging	3 g
Pepton	5 g
Agar	15 g
Aquades	1000 ml
pH	6,8

➤ **PDA (*Potato Dextrose Agar*)**

Infusi Kentang	200 g
Dekstroza	20 g
Agar	15 g
Aquades	800 ml
pH	6,0

➤ **APDA (*Acidified Potato Dextrose Agar*)**

Infusi Kentang	200 g
Dekstroza	20 g
Agar	15 g
Aquades	800 ml
pH	3,0 - 4,0

➤ **ENDO Agar**

Pepton	10 g	
Laktosa		10 g
K ₂ HPO ₄		5 g
Basic fuchsin		0,2 g
Agar		15 g
Aquades		800 ml
pH		3,0 - 4,0

➤ **VRBA (*Violet Red Bile Agar*)**

Yeast ekstrak		3 g
Pepton		7 g
Garam bile No.3		1,5 g
Laktosa		10 g
NaCl		5 g
Merah netral	0,03 g	
Violet kristal		0,002 g
Agar		15 g
Aquades		1000 ml
pH		7,4

➤ **LB (*Lactosa Broth*)**

Ekstrak daging		3 g
Pepton		5 g
Laktosa	5 g	
Aquades		1000 ml
pH		6,8

➤ **MR-VP (*Proteose Broth*)**

Pepton		5g
K ₂ HPO ₄		5g
Glukosa		5g
Aquades		1000ml
pH		7,5

Cara : Larutkan semua bahan dalam aquades kecuali glukosa, panaskan sampai semua bahan larut. Saring dan atur pH = 7,5. Tambahkan glukosa.

➤ **Koser Citrate Agar**

NaCl	5	g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,28	g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1	g
K ₂ HPO ₄	1	g
Na-Citrate	2	g
Aquades	1000	ml
pH	6,8	

➤ **Trypton 1% Broth**

Trypton	10	g
Aquades	1000	ml

➤ **Reagen Kovac's**

p-Dimetilaminobenzaldehida	5	g
Amil alkohol	75	ml
HCl pekat	25	ml

➤ **Reagen Methyl Red**

Methyl Red (bubuk)	0,1	g
Etanol 95%	300	ml
Aquades	500	ml

Cara : Larutkan Methyl red dalam etanol, setelah semuanya larut tambahkan aquades sampai 500 ml.

➤ **Pewarnaan Gram**

• **Gram A**

Kristal Violet	20	g
Ethanol 95%	100	ml

Cara : campurkan kedua bahan tersebut lalu saring. Masukkan kedalam botol bersih.

• **Gram B**

Kristal iodium	20	g
Kalium iodida	2	g

Cara : Setelah kedua bahan tersebut larut tambahkan aquades 240 ml dan larutan Natrium bikarbonat 5% sebanyak 60 ml. Kemudian larutan tersebut disaring.

• **Gram C**

Etanol 95%	250	ml
------------	-----	----

Aseton	250	ml
--------	-----	----

- **Gram D**

Safanin	2,5	g
---------	-----	---

Etanol 95%	100	ml
------------	-----	----

Cara : encerkan larutan baku safranin 1 bagian dan 5 bagian air.

BAB V SAMPEL DALAM ANALISA MIKROBIOLOGI

Pada bagian ini diuraikan mengenai arti penting teknik pengambilan sampel dan preparasi sampel khusus digunakan untuk menganalisa bakteri, namun tidak cocok untuk virus atau protozoa. Seringkali terjadi kesalahan yang terjadi pada tahap awal analisa ini. Sebaik atau seakurat apapun suatu analisa, akan menjadi sia-sia jika pengambilan sampel dilakukan dengan tidak benar. Pengambilan sampel yang representatif dan terstandarisasi sangat diperlukan sehingga didapatkan hasil analisa yang berarti dan signifikan secara statistik.

A. Peraturan umum pengambilan sampel

Sampel yang representatif adalah sampel yang sebisa mungkin mencerminkan dan menggambarkan komposisi dari suatu bagian atau batch (partai) tertentu. Harus dipastikan bahwa diambil jumlah yang cukup pada saat pengambilan sampel dan dihindari segala bentuk kesalahan yang dapat menyebabkan sampel menjadi bias. Sebaiknya sebelum dilakukan pengambilan sampel terlebih dahulu diperhitungkan kemungkinan-kemungkinan yang terjadi dengan bakteri pada sampel, seperti nasib sel setelah dilakukan pengambilan sampel, kemungkinan sel menjadi mati atau malah bertambah sehingga hal ini perlu diantisipasi. Selain itu perlu dipertimbangkan pula distribusi bakteri sehingga sampel yang diambil dapat mewakili sepenuhnya. Kehomogenan mikroorganisme pada air sungai mengalir dan air sungai yang menggenang tentu berbeda sama sekali.

Prinsip pengambilan sampel secara umum adalah:

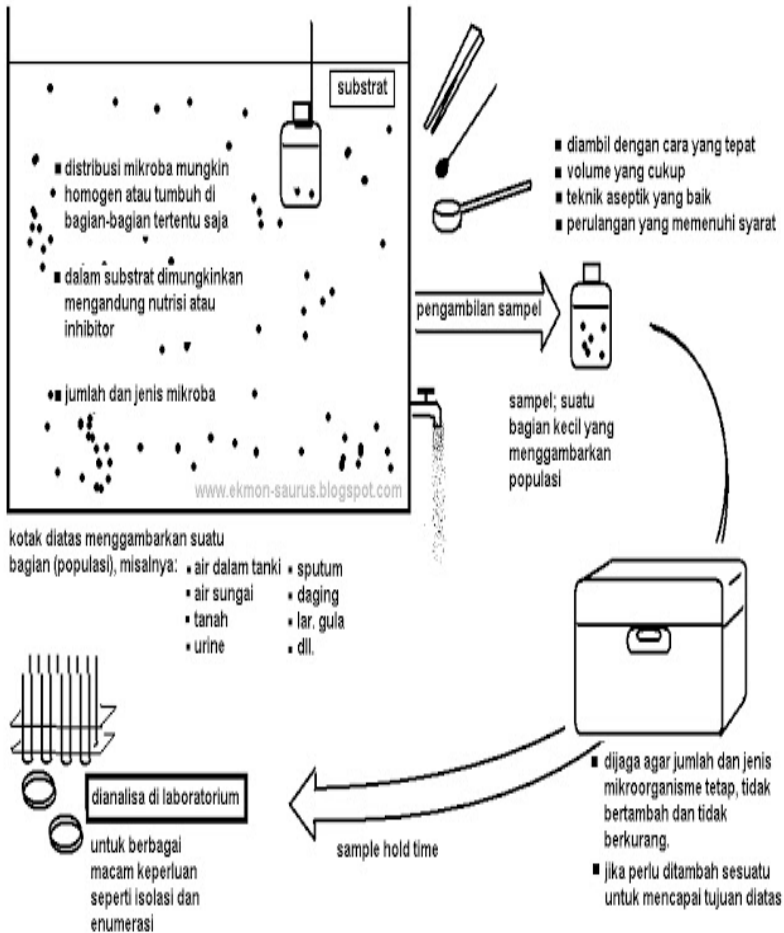
- Suatu bagian tertentu (dapat digambarkan sebagai batch/populasi) yang mengandung jenis dan jumlah bakteri tertentu.
- Dari batch tersebut diambil sebagian kecil volumenya untuk diinterpretasikan sesuai dengan kebutuhan.

- Sebagian kecil yang diambil ini (sampel) harus sedapat mungkin menggambarkan dari batch (populasi) tersebut baik dari segi jumlah ataupun jenis bakteri yang ada.
- Pengambilan sampel harus memenuhi syarat secara statistik bila ditinjau dari volume yang diambil dan perulangan yang dilakukan.
- Pada saat pengambilan sampel diharuskan supaya bakteri yang masuk ke dalam wadah penampung sampel benar-benar berasal dari sumbernya, bukan berasal dari lingkungan sekitar.
- Sampel yang mengandung bakteri tersebut dijaga supaya tetap menggambarkan kondisi yang ada sebelum memasuki tahap analisa.

Demi tercapainya tujuan diatas, maka dibutuhkan beberapa syarat tertentu yaitu:

- Semua peralatan pengambilan sampel harus steril dan dilindungi dari kontaminasi sebelum dan sesudah pengambilan sampel dilakukan.
- Dikerjakan dengan prosedur kerja aseptik yang baik dan dengan senyawa desinfektan yang sesuai.
- Dipilih peralatan atau wadah sampel yang cocok dan metode pengambilan yang sesuai dengan jenis sampel.
- Sebaiknya dilaksanakan pencegahan kontaminasi dari operator dengan memakai sarung tangan dan masker. Pengambilan sampel sebaiknya dilakukan pada tempat yang sedikit atau tidak terdapat aliran udara.
- Setelah diambil, sampel langsung dianalisa. Pencegahan pertumbuhan mikroorganisme dapat disimpan pada suhu dingin. Jika perlu dapat ditambahkan suatu zat ke dalam sampel dengan tujuan melindungi mikroorganisme dari kerusakan.
- Pelabelan sampel harus mengandung nama sampel, waktu pengambilan, tempat pengambilan, nama operator dan keterangan lain yang mendukung.
- Secara umum sampel dengan konsentrasi bakteri yang melimpah tidak begitu membutuhkan teknik aseptik yang tinggi. Beberapa buah sel bakteri kontaminan dari udara tidak akan berpengaruh

banyak pada sampel 100 ml air limbah rumah tangga, tetapi akan sangat berpengaruh pada pengambilan sampel meja Laminar Air Flow dengan teknik *Contact Plate*.



Gambar. 4 Cara pengambilan sampel secara umum

B. Alat yang digunakan dalam sampling

Contoh peralatan yang biasa dipakai diantaranya adalah botol kaca, botol plastik, pinset, spatula, pipet, sendok, pisau, gunting dll. Peralatan yang berupa wadah penampung harus steril bagian dalamnya sedangkan bagian luarnya sebaiknya didesinfeksi dengan senyawa-senyawa antimikroba seperti etanol, sodium hipoklorit dll, sedangkan peralatan untuk mengambil harus disterilisasi dengan cara yang tepat. Peralatan jangan sampai mengandung sisa-sisa senyawa yang dapat menghambat mikroorganisme, misalnya sisa deterjen pada botol dari pencucian rutin atau sisa karat yang ada pada spatula. Semua peralatan juga tidak boleh terdapat sisa bahan yang berpotensi menjadi nutrisi seperti sisa agar atau gula. Botol sampel yang digunakan dapat terbuat dari kaca atau plastik tahan panas dengan ukuran yang cocok. Jenis botol yang direkomendasikan adalah botol gelas Borosilicate berpenutup ulir dan lebih baik jika bermulut botol lebar. Jika menggunakan botol plastik sebaiknya terbuat dari material yang tidak beracun seperti polypropilene yang tahan disterilisasi dengan autoklaf berulang-ulang. Bila dirasa perlu tutup botol dapat dibungkus dengan aluminum foil agar bagian leher botol lebih terhindar dari kontaminasi. Kantong plastik juga bisa dipakai, keuntungannya adalah mengurangi berat dan resiko botol pecah.

C. Teknik pengambilan dan preparasi sampel berdasarkan jenis sampel

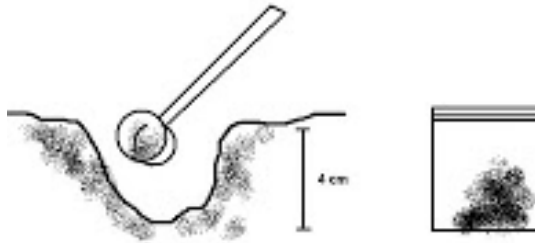
1. Sampel padat

a. pengambilan sampel padat

Pengambilan sampel dapat dilakukan dengan pinset, spatula atau alat lain lalu dimasukkan ke dalam wadah steril. Beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pengambilan sampel padat adalah: aliran udara di sekitar sampel, stratifikasi dan distribusi karakteristik mikroorganisme pada sampel dan kedalaman atau letak sampel.

1) pengambilan sampel tanah, kompos dan lumpur

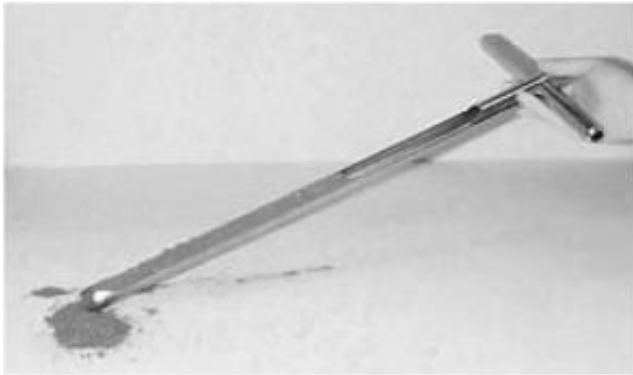
Sampel tanah secara umum diambil dengan kedalaman minimal 4 cm untuk memperkecil kemungkinan mendapat mikroorganisme yang bukan berasal dari tanah (hal ini bersifat relatif dan tergantung kebutuhan). Sebaiknya diambil tanah yang tidak mengandung atau berkaitan dengan jaringan akar tumbuhan.



Gambar. 5 Cara pengambilan sampel tanah, kompos dan lumpur

Pengambilan sampel tanah dapat juga menggunakan *handsoil auger* (gurdi atau penggerek tanah). Prinsip kerjanya adalah dengan menusukkan suatu pipa dengan kedalaman tertentu sehingga tanah yang memiliki lapisan-lapisan akan masuk ke dalam pipa sesuai dengan lapisannya. Alat ini dapat digunakan sampai kedalaman 180 cm. Kemungkinan resiko kontaminan dari bakteri permukaan dapat terjadi saat pipa dimasukkan ke permukaan tanah tetapi dapat diminimalisasi dengan membuang tanah yang berada pada sisi pipa dengan spatula. Pembersihan pipa jika digunakan untuk pengambilan sampel selanjutnya adalah dengan mencuci sisa tanah dengan air lalu dibilas dengan 75% etanol kemudian dibilas lagi dengan air steril. Pengambilan sampel dengan cara ini akan lebih meningkatkan kepresisian karena tanah sangat berkaitan erat dengan beberapa faktor penting seperti konsentrasi oksigen, kelembaban dan kandungan bahan organik yang sangat berhubungan dengan kedalaman dan lapisan tanah. Namun kekurangannya yaitu tidak cocok jika digunakan untuk mengambil sampel tanah yang memiliki banyak bebatuan. Selain itu karena keheterogenan karakteristik mikroorganisme tanah yang tinggi dan dengan keterbatasan diameter pipa auger maka dapat memperkecil

kemungkinan terambilnya sampel yang representatif. Hal ini dapat diatasi dengan banyaknya sampel tapi akan mempengaruhi biaya analisa yang dilakukan. Untuk sampel tanah yang lebih dalam dapat dipakai alat yang dirancang untuk tujuan tersebut seperti air rotary drilling atau hollow stem auger drilling yang mampu mencapai kedalaman puluhan meter.



Gambar. 6 *hand soil auger* untuk sampling tanah dan lumpur

2) Pengambilan sampel daging

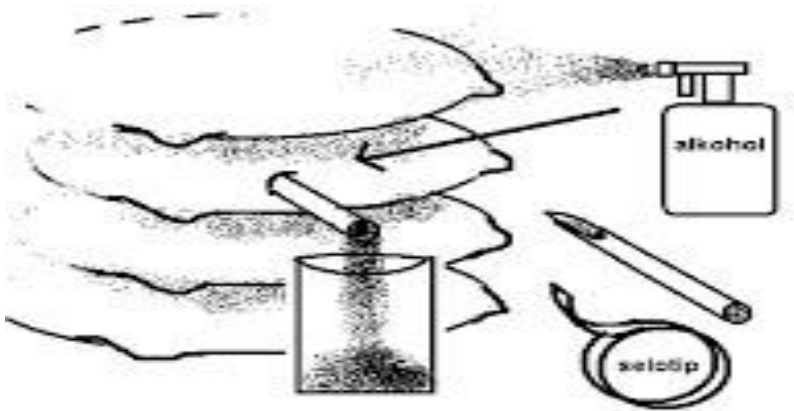
Pengambilan sampel daging lebih baik dipilih daging yang tidak kontak dengan udara langsung (terletak dipermukaan) dan jarang dipegang oleh tangan, diperhatikan juga aliran udara yang ada.



Gambar. 7 Pengambilan sampel daging berupa ikan

3) pengambilan sampel gula atau beras pada karung

Sampel ini dapat diambil dengan cara yang praktis yaitu menusuk karung dengan suatu pipa runcing steril kemudian sampel ditampung pada kantung plastik steril. Sebelum dilakukan pengambilan sampel, titik yang akan ditusuk disemprot dahulu menggunakan etanol 70% dan di drain beberapa detik ke dalam plastik penampung pertama (bukan sampel), setelah selesai maka kucuran butir sampel ditampung ke dalam plastik steril bersekat dan bekas tusukan ditutup dengan selotip.



Gambar. 8 Pengambilan sampel gula atau beras pada karung

b. preparasi sampel berbahan padat dengan dihancurkan

Preparasi sampel ini dengan cara ditumbuk, diblender atau cukup dilarutkan air saja. Sampel diharuskan hancur menjadi partikel kecil supaya dapat dilarutkan air sehingga diperoleh mikroorganisme yang berada baik di dalam atau di permukaan sampel.

1) Preparasi sampel dengan dilarutkan

Untuk sampel tanah, lumpur, tanah kompos, gula pasir, bubuk dan sampel lain yang mudah larut cukup dicampurkan kedalam air atau

buffer fosfat dengan pengenceran 1/10 nya. Pengocokan dilakukan sebanyak 25 kali dengan busur atau ketinggian 30 cm selama 7 detik. Dengan cara ini akan memaksimalkan homogenisasi mikroorganisme pada pelarut. Jika setelah dikocok dan dibiarkan beberapa saat sampel menjadi terendap maka dikocok lagi beberapa kali untuk ditransfer ke pengenceran selanjutnya. Preparasi ini sebaiknya dilakukan pada tabung berpenutup ulir sehingga terjamin dari tumpahnya air. Jika terdapat batu kecil atau kerikil di dalamnya maka tidak perlu dihancurkan.

2) Preparasi sampel dengan penumbukan (*maseration*)

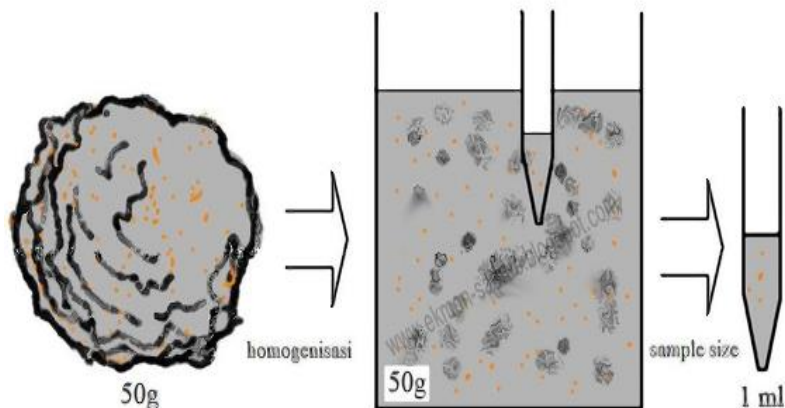
Cara ini dilakukan dengan ditumbuk pada mortar dengan paste yang menggunakan teknik aseptis yang baik. Kelebihan teknik ini adalah praktis, tanpa penambahan pelarut dan cocok untuk sampel dengan skala kecil tetapi memiliki resiko kontaminasi yang tinggi mengingat besarnya permukaan yang kontak dengan udara sekitar dan keterpaparan yang lama saat penumbukan. Selain itu seringkali dijumpai alat yang masih terdapat sisa obat atau bahan lain yang sulit dibilas karena mortar dan paste juga sering dipakai untuk menghancurkan tablet antibiotik atau daun yang mengandung antimikroba.

3) Preparasi sampel padat dengan penghancuran mekanis (*mechanical blending/stomaching*).

Cara ini adalah alternatif yang lebih efisien dan cocok digunakan untuk sampel yang sulit ditumbuk (seperti kacang, buah dll.) dan dalam skala besar. Selain itu jalan ini lebih meminimalisir kontaminan saat dilakukan penumbukan dan juga hasil penghancurannya lebih halus. Penghancuran menggunakan blender dan stomacher termasuk homogenisasi mekanis. Homogenisasi sampel tentunya menjadi tahap yang krusial dalam praktik mikrobiologi di laboratorium. Sebagian besar metode yang diperlukan untuk mengumpulkan data penelitian seperti proses perhitungan atau isolasi pasti melewati tahap ini. Tahap ini begitu umum sehingga seringkali diabaikan dan lebih fokus kepada analisa akhir seperti pemilihan media selektif atau skrining bakteri. Tahap penghomogenisasian ini begitu

penting terutama untuk analisa mikrobiologi kuantitatif karena melibatkan proses perhitungan yang mengkondisikan bahwa sampel mengandung mikroorganisme yang rata penyebarannya.

Salah satu tahap preparasi sampel setelah penimbangan ini bertujuan melarutkan mikroorganisme yang terdapat pada sampel ke dalam diluents sehingga mudah disebar di media atau diencerkan. Semua mikroorganisme baik berada di dalam atau di permukaan sampel tersebut harus dapat dihitung. Tujuan perlakuan ini adalah untuk memastikan distribusi sel mikroorganisme secara rata dalam pelarut pada pengenceran 1/10. Hasil proses homogenisasi atau penghancuran yang baik adalah sejumlah sel dalam sampel terdistribusi sempurna, tingkat keacakan yang tinggi, lepas dari substratnya, tidak berkurang karena mati/terluka akibat perlakuan (recovery tinggi), dan tidak bertambah (terkontaminasi). Semua ini demi mempertinggi kemungkinan diperolehnya mikroorganisme target atau memperbesar akurasi dan presisi hasil perhitungan.



Gambar 9. Preparasi sampel padat

Perbandingan antara blender dan stomacher

Secara teknis proses penghancuran dengan cara blending adalah dengan mencacah berkali-kali sampel dengan pisau yang berputar cepat. Dengan mekanisme tersebut sampel akan benar-benar tercacah menjadi partikel kecil. Pada mulanya preparasi sampel untuk semua metode mikrobiologi menggunakan blender (umumnya waring), tetapi Sharp dan Jackson mulai memperkenalkan cara baru menggunakan stomacher pada tahun 1972. Sharp dan Jackson (1972) menyebutkan bahwa cara preparasi menggunakan stomacher adalah dengan menempatkan sampel pada plastik steril khusus kemudian ditekan dan dikocok oleh dua pedal mesin berkali-kali secara bergantian sehingga bakteri pada sampel dapat keluar dan terlarut dalam diluents. Plastik penampung sampel dapat dibuang setelah dipakai.

Tabel 4. Perbandingan penghancuran dengan blender dan stomacher

Perbedaan	Blender	Stomacher
Wadah/ kontainer	Perlu dicuci dan sterilisasi ulang, boros tempat penyimpanan.	Sekali pakai, dan lebih menghemat tempat dalam penyimpanan
Distribusi sel relatif	Lebih merata dan homogen	Kurang homogen karena ada kemungkinan terdapat sel di dalam seresah sampel berukuran besar.
Partikel sampel	Lebih kecil karena tercacah sempurna	Lebih besar karena hanya ditekan dan dikocok
Peningkatan suhu	Lebih besar karena gaya gesek akibat perputaran yang intensif	Tidak signifikan
Kemungkinan sel rusak	Lebih besar karena proses perusakan sampel yang ekstensif terutama untuk hifa	Lebih kecil karena tidak mengalami kontak dengan pedal
Jenis sampel	Cocok untuk sampel sulit dihancurkan (daging, kacang dll.)	Cocok untuk sampel lunak (seperti buah atau telur)

Pemipetan	Relatif lebih mudah karena partikel sampel berukuran kecil	Relatif terganggu, namun sudah terpecahkan dengan adanya plastik berpenyaring.
Penempatan homogenat	Dalam botol, sehingga mudah untuk dikocok ulang	Dalam plastik, relatif sulit untuk dikocok manual
Faktor yang berpengaruh	Waktu, kecepatan (rpm), volume diluent	Waktu, jarak pedal dengan tutup (jarak penekanan), kecepatan pedal
Volume wadah	Umumnya 1L (volume minimal pelarut sebaiknya menutupi pisau putar)	Umumnya 40-400 ml (sesuai kompartemen mesin)



Gambar 10. Alat Penghancur sampel padat: a. Blender; b. Stomacher

Beberapa penelitian mengenai pencarian cara mana yang efektif dan akurat dalam penghomogenisasian menghasilkan data yang

berbeda-beda dengan sampel yang beragam. Thrasher dan Richardson (1980) menyatakan bahwa sampel whey cream yang dihomogenisasi dengan stomacher memiliki jumlah mikroorganisme sedikit lebih tinggi dari pada homogenat blender. Sedangkan sampel keju cheddar menghasilkan data hitungan yang sama. Sampel lain (ice cream dan salad mixture) menunjukkan jumlah mikroorganisme pada homogenat blender sedikit lebih besar dari pada stomacher. Dari data tersebut, mereka menyimpulkan bahwa perbedaan dua cara ini tidak signifikan.

Sampel leafy green (540 uji) dengan analisa *salmonella* menghasilkan recovery lebih tinggi pada homogenat stomacher (293 positif) dibandingkan dengan homogenat blender (232 positif) Jacobson et.al. (2012). Tidak ada perbedaan nyata antara homogenisasi menggunakan stomaching atau blending dengan waktu homogenisasi antara 0,5-5 menit pada analisa *L. monocytogenes* dari sampelbeef tissue (Dickson, 1990) Andrews et.al. (1978) dalam Dickson (1990) melaporkan bahwa hitungan APC untuk sampel ground beef dan sausage pork menghasilkan hasil hitungan yang menunjukkan bahwa jumlah mikroorganisme pada homogenat stomacher adalah 51-94% dari jumlah yang ter-recovery dari proses blending.

Proses blending atau stomaching menghasilkan data hasil perhitungan yang beragam tergantung jenis sampel yang dianalisa. Stomacher menghasilkan data yang lebih tinggi pada sampel : carcass, cheese, ground beef, meat seafood dan coocked food. Blender menghasilkan data yang sedikit lebih tinggi dengan analisa/sampel: *coliform* dan *salmonella* (pada *fatty foods*), *salmonella* (pada telur), *S.aureus*, *S.faecalis*, *B.cereus*, *C. perfringens* (pada karkas ayam), dan *enterobacteriaceae* (pada ayam) (Lund et.al. 2000).

Alasan proses blending yang menghasilkan data pertumbuhan lebih rendah adalah ikut matinya mikroorganisme target ketika sampel diblender yang dipengaruhi oleh kecepatan, jenis pelarut dan waktu proses. Sedangkan sebab hasil hitungan homogenat stomacher lebih rendah adalah karena kurang hancur dan teraduknya sampel sehingga masih terdapat banyak sel mikroorganisme di dalam seresah sampel yang tidak tersebar dan terambil oleh pipet.

Cara yang dipakai pada metode resmi internasional untuk proses homogenisasi bahan-bahan non cair yaitu :

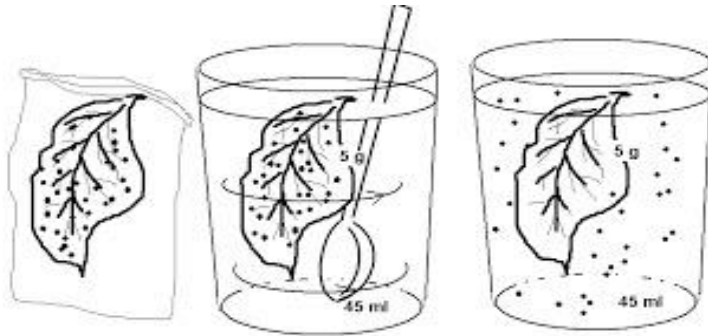
- *peristaltic blender (stomacher)* yang dilengkapi dengan kantung plastik steril dan pengatur kecepatan dan waktu. Proses homogenisasi dilakukan 1-3 menit sesuai jenis sampel. Metode ini tidak disarankan untuk sampel seperti bahan yang dapat merusak plastik (partikel bersifat tajam, keras dan kering) dan bahan yang sulit untuk dihancurkan karena sifat teksturnya seperti salami-type sausage.
- *Rotary homogenizer (blender)* dengan pengatur kecepatan bertahap antara 8.000 rpm sampai 45.000 rpm dan kontainer steril yang terbuat dari gelas atau metal berpenutup. Blender dioperasikan dengan kecepatan 15.000-20.000 rpm selama tidak lebih dari 2,5 menit meskipun dengan kecepatan paling rendah.
- *Vibrational mixer (pulsifier)* dengan kantung steril. Proses ini dilakukan 0,5-1 menit. Jika mikroorganisme berada jauh di dalam struktur sampel maka sampel harus dipotong-potong sebelum dihomogenisasi.
- pengadukan manual dengan *glass beads* berdiameter +/- 6 mm. alat ini digunakan untuk sampel yang lengket, lunak atau kental.

Jika kita dihadapkan kepada dua pilihan cara dalam mendapatkan homogenat, antara blender atau stomacher maka sebaiknya hal yang harus dipertimbangkan adalah: sumber metode resmi yang diikuti dan jenis sampel yang umumnya dianalisa. Pada umumnya ketiga sumber yang disebutkan diatas telah memenuhi syarat dan dapat dipertanggungjawabkan karena sudah tervalidasi.

c. preparasi sampel berbahan padat dengan dibilas (*rinse technique*)

Tujuan cara ini adalah untuk memperoleh mikroorganisme yang menempel pada permukaan suatu benda dan dihindari mikroorganisme yang berada didalam sampel atau alasan lainnya.

- 1) preparasi sampel seperti sayur, daun, buah dll.



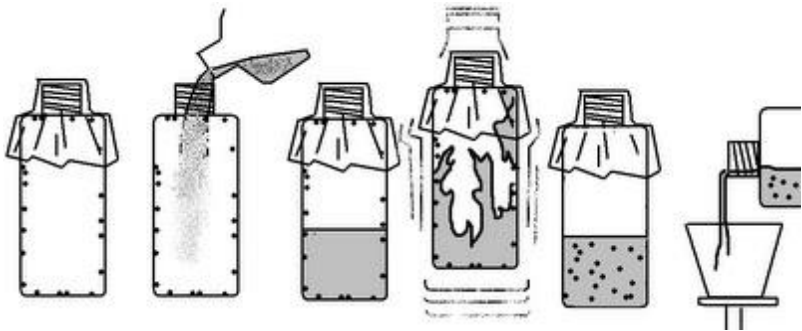
Gambar 11. Preparasi sampel seperti sayur, daun dan buah

Sampel dimasukkan kedalam 0,1% pepton water yang mengandung 1% tergitol lalu diaduk atau dikocok selama 15-30 menit dan didiamkan 30 menit selanjutnya homogenkan lagi 10-15 detik. Sebaiknya berat sampel (sayur misalnya) yang dimasukkan sebanyak 100 g lalu ditambah 200 ml pelarut. Pengocokan sebaiknya dilakukan dengan hati-hati supaya tidak merusak kulit buah atau sayur yang dimungkinkan memiliki kandungan senyawa antimikroba terutama pada buah yang berasa asam. Buah atau sampel lain yang berukuran besar (seperti semangka dan melon) sebaiknya tidak menggunakan teknik ini karena akan menghasilkan rasio perbedaan yang mencolok antara luas permukaan dan volumenya atau beratnya sehingga menimbulkan masalah dalam perhitungan pengenceran yang dilakukan (w/v).

- 2) Preparasi sampel botol kosong atau wadah lain

Tujuannya adalah untuk menghitung jumlah mikroorganisme yang terdapat pada permukaan bagian dalam botol setelah dilakukan pencucian dan sebelum dituang beverages. Analisa botol kosong ini umumnya dipakai pada industri minuman dan makanan. Pelarut yang dimasukkan dapat berupa quarter strength ringer solution yang mengandung 0,05% sodium thiosulphate sebanyak 20 ml untuk tiap botol. Volume pembilas yang ditambahkan disini tidak diperhitungkan

karena satuan hasil akhir yang dipakai adalah CFU/botol. Namun yang perlu dipertimbangkan adalah jika terlalu sedikit volume pembilas maka dikhawatirkan tidak akan mencakup semua permukaan dalam botol (misalnya 5 ml untuk botol ukuran 500 ml) tapi jika terlalu besar volume yang ditambahkan maka pengocokan menjadi tidak efisien karena memperkecil ruang udara dalam botol (misalnya 470 ml untuk botol ukuran 500 ml).



Gambar 12. Preparasi sampel botol kosong

d. Pengambilan sampel permukaan padat

1) teknik swab (*swab technique*)

Tujuan cara ini adalah untuk memperoleh mikroorganisme yang umumnya menempel pada permukaan suatu benda dan sangat kecil kemungkinan atau tidak ada mikroorganisme yang berada di dalam sampel. Alat umum untuk teknik swab adalah menggunakan *cotton-tipped swab stick*. Keunggulan teknik swab dengan pelarut adalah (1) mengurangi resiko tumbuhnya koloni yang bertindihan karena sel-sel dihomogenisasikan dahulu ke dalam pelarut. (2) cocok untuk jenis sampel yang mempunyai permukaan tidak rata atau datar seperti pipa, tutup botol, (3) lebih akurat untuk tujuan menghitung bakteri.

Bila tujuan analisa berdasarkan alasan kualitatif maka hasil swab dapat langsung diulaskan ke permukaan agar namun jika untuk alasan kuantitatif harus menggunakan pelarut atau extraction fluid.

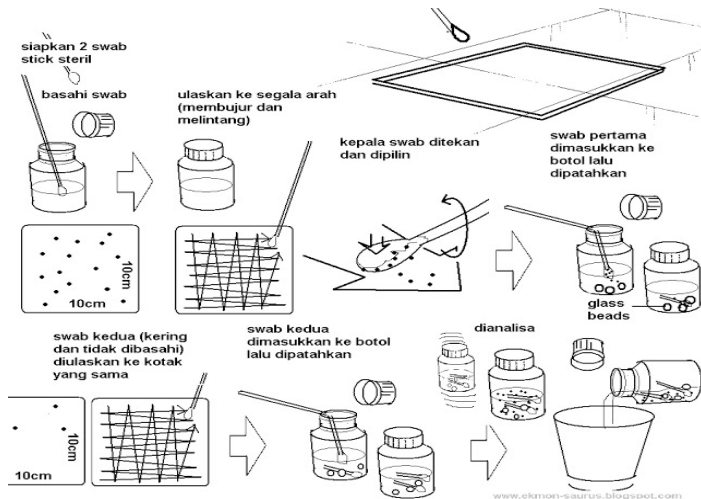
Pelarut swab dapat berupa air deionisasi, 0,25% pepton water ditambah 0,1% Tween 80 atau phosphate-buffered saline. Swab sebaiknya menggunakan kapas yang basah untuk permukaan sampel yang kering. Jika area swab telah dibersihkan dengan suatu zat antimikroba (misalnya chlorine) maka larutan pelarut sebaiknya ditambah senyawa penetralisir yang cocok dan cukup. Disarankan menggunakan pelarut penetralisir (neutralizer solution) yaitu lecitine 3g/L, polysorbate 80 30g/L, sodium thiosulphate 5g/L, dan t-histidine 1g/L dengan volume total 10ml.

Satuan akhir untuk teknik swab dengan tujuan enumerasi dapat ditentukan dalam CFU/satuan luas (CFU/100 cm²) atau CFU/sampel benda (CFU/tutup botol). Untuk kepentingan menghitung mikroorganisme swab umumnya dikerjakan pada transek yang berukuran 5x5 cm atau 10x10 cm. Luasan ini cukup efisien untuk mentransfer mikroorganisme yang berada di permukaannya ke satu kepala swab yang kecil. Semakin besar luas permukaan yang diswab maka semakin kecil kemungkinan bakteri yang akan tercover oleh kepala swab. Untuk pengambilan sampel dengan area permukaan yang luas bias digunakan dengan sterile sponge. Hal yang perlu diperhatikan jika menghadapi masalah tersebut adalah perkiraan jumlah mikroorganisme yang berada pada permukaan sampel (tingkat kekotoran) dan luas area yang harus dikerjakan. Sebagai catatan dalam teknik ini adalah sel yang terekstraksi dari kepala swab dapat memasuki alur pengenceran bertingkat jika load mikroorganisme terlalu banyak dengan memperhitungkan volume pelarutnya yang nanti hasilnya harus dikonversikan per satuan luas bukan per satuan volume. Selain itu, satu botol pelarut tidak dapat dibagi menjadi dua untuk tujuan analisa yang berbeda, misalnya satu kali pengambilan swab dengan pelarut 40 ml pada filling tube tidak dapat untuk menganalisa APC sebanyak 20 ml dan *coliform* 20 ml sisanya. Perlakuan ini sama saja dengan membagi dua sisi kepala swab.

Untuk mengefisiensikan penempelan sel bakteri pada kepala swab saat ini telah dikembangkan kepala swab dari serat nylon (nylon flocked swab) yang tersedia secara komersial. Serat ini lebih baik dipakai untuk teknik swab dari pada serat cotton karena seringkali masih terdapat bakteri yang terperangkap pada serat cotton setelah dilarutkan.

Swab yang benar dan menghasilkan data yang akurat dilakukan dengan cara:

- a) Siapkan dua batang swab (swab stick) steril kering dan botol yang berisi larutan pelarut dengan 3-4 glass beads (diameter 3mm). tentukan area swab dengan menandainya dengan semacam transek logam steril (sterile metal guide) sebagai template swab, misalnya memakai aluminium.
- b) Basahi batang swab pertama dengan pelarut lalu ulaskan ke permukaan sampel dengan cara dipilin dan sedikit ditekan. Ulas seluruh permukaan, untuk memudahkannya ulaskan melintang dan membujur zig-zag sehingga semua permukaan akan tercakupi. Jika kontur tidak rata maka perlu diperhatikan bagian yang cekung atau berlekuk.
- c) Masukkan batang swab pertama ke dalam botol lalu patahkan ujung batang swab. Jangan sampai bagian yang terpatahkan terpegang tangan.
- d) Ulas area yang sama menggunakan batang swab kedua yang kering dengan cara yang sama seperti diatas. Hal ini ditujukan untuk mengulas mikroorganisme yang tidak terambil oleh swab pertama. Patahkan dan masukkan swab kedua seperti cara diatas.
- e) Kocok kedua batang swab kurang lebih 25 kali. Glass beads akan membantu melepaskan sel yang menempel pada kapas.



Gambar 13. Sampel permukaan padat dengan teknik swab

2) Teknik contact plate/*contact agar*

Pengambilan sampel menggunakan cara ini adalah dengan menempelkan media pertumbuhan pada permukaan sampel. Cara ini cukup praktis dan tidak memerlukan teknik khusus. Kelebihannya yaitu sederhana, cocok untuk sampel dengan konsentrasi rendah, baik digunakan pada permukaan yang rata, cocok untuk pengambilan sampel dengan jumlah yang banyak dan menghemat waktu. Namun kekurangannya adalah tidak akurat untuk menghitung bakteri karena kemungkinan koloni bertindihan semakin besar jika persebaran sel mengelompok. Teknik ini lebih sesuai untuk cukup mengetahui tren keberadaan mikroorganisme seperti contact plate pada dinding, lantai atau meja di rumah sakit dalam rangka mengevaluasi efektivitas antimikroba.

Pada permulaannya teknik ini mudah digunakan untuk sampling permukaan benda yang kecil seperti makanan, alat kecil atau telapak tangan. Namun cawan yang berisi agar (biasanya ketinggian permukaan agar lebih rendah daripada cawan) menimbulkan kesulitan dalam penempelan ke permukaan sampel yang rata seperti lantai atau

meja. Untuk mengatasi hal itu maka dirancang suatu wadah agar yang prinsip kerjanya mirip dengan suntikan (syringe) dengan diameter besar sehingga agar yang dituangkan dapat digeser ke permukaan sehingga seluruh lingkaran permukaannya dapat ditekan kontak dengan permukaan sampel, selanjutnya agar dipindah ke dalam cawan petri standar untuk diinkubasi. Cara lainnya yaitu dengan membuat replika untuk menempelkan sel dari permukaan sampel kemudian lempengan replika tersebut ditempelkan lagi untuk mentransfer ke permukaan agar. Saat ini tersedia secara komersial cawan petri sekali buang (disposable plastic contact plate) yang dapat menekan agar untuk kontak sementara waktu ke permukaan sampel seperti prinsip suntikan. Penuangan agar pada cawan ini membutuhkan kehati-hatian yang tinggi karena jika media berlebih dan luber maka cawan sebaiknya tidak digunakan. Oleh karena itu penambahan agar lebih tepat dilakukan dengan pipet otomatis sehingga volume media sesuai dengan yang direkomendasikan. Permukaan agar setelah memadat harus kering, jika basah maka penempelan sel ke permukaan agar menjadi tidak efisien. Senyawa penetralisir dapat ditambahkan ke dalam media bila teknik ini digunakan untuk mengukur efisiensi prosedur sanitasi.

2. sampel cair

a. pengambilan sampel cair

Sampling bahan cair memiliki teknik yang berbeda dengan sampel padat, beberapa hal yang perlu diperhatikan dalam pengambilan sampel air untuk mikrobiologi adalah :

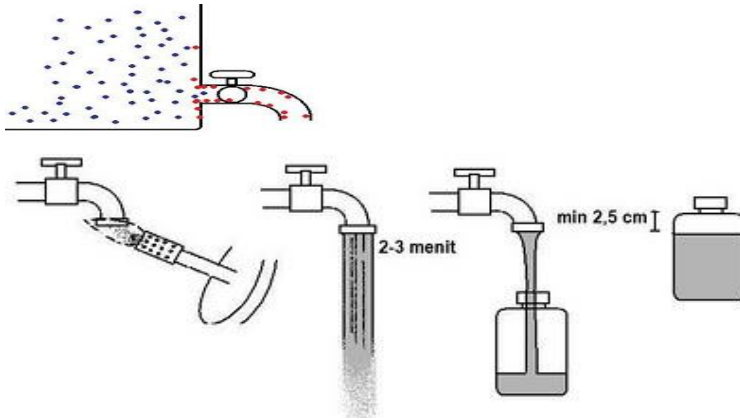
- Aliran atau arus yang terjadi pada sampel, misalnya adanya pengaduk, kecepatan aliran dll.
- Biofilm yang terbentuk pada dinding wadah penampung air atau pipa.
- Sedimen atau endapan yang terjadi
- Selalu sisakan ruang udara dalam botol (minimal 2,5cm atau +/- 1 inchi dari tutup botol) untuk proses pengocokan.
- Umumnya volume sampel yang diambil tiap unit adalah 100 ml (APHA) atau 200 ml (WHO). Sample size yang dipilih

tergantung tujuan analisa. Pengambilan sampel dapat menggunakan botol bervolume 125 ml.

- Kedalaman pengambilan sampel
- Benda yang mengapung atau melayang di badan air, misalnya sampah
- Kandungan senyawa antimikroba pada sampel, misalnya chlorine
- Pengambilan sampel cair yang berasal dari kran atau pipa

Inti dari pengambilan sampel dari kran atau pipa adalah meniadakan bakteri yang menjadi biofilm pada mulut kran (dikhawatirkan jenisnya berbeda) dan memasukkan bakteri umum yang terlarut pada sampel. Tahap-tahap pengambilan sampel untuk menghasilkan tujuan diatas adalah:

- 1) Pilih pipa atau kran yang disuplai langsung atau paling mendekati dari tanki utama. Sebaiknya pilih kran yang bersih, sering digunakan dan tidak bocor. Lapisan air dari kran yang bocor sering ditumbuhi banyak biofilm. Jika kran kotor maka dapat dibersihkan dengan Sodium Hypochlorite(100 mg NaOCl /L).
- 2) Semprot udara sekitar kemudian mulut kran dengan etanol 70%. Bakar mulut kran dengan pembakar bunsen saat etanol belum menguap supaya biofilm yang terbentuk dapat mati secara cepat. Jika dirasa hal ini terlalu beresiko maka cukup dibakar saat kran kering. Bila kran terbuat dari plastik maka cukup disemprot etanol saja.
- 3) Drain air selama 2-3 menit. Drain dengan debit menengah atau besar dengan tujuan untuk mencuci kran dan menunggu bakteri umum yang benar-benar dari tanki melewati kran. Perhatikan juga volume yang tersisa pada tangki saat pengambilan sampel.
- 4) Saat memasukkan air ke botol sampel, debit air dikecilkan sampai air saat memasuki botol tidak terlalu deras dan menimbulkan cipratan. Isi botol dengan air, jangan sampai overflow dan sisakan ruang udara dengan jarak min 2,5 cm dari tutup botol.



Gambar 14. Pengambilan sampel cair

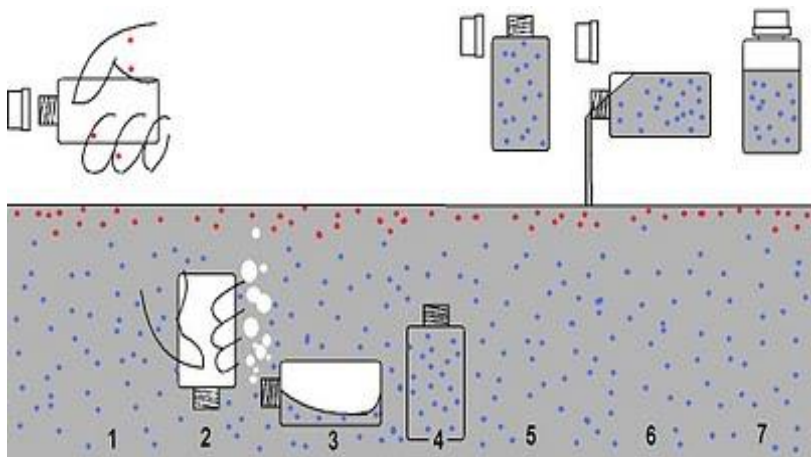
Pengambilan sampel air sungai, air kolam, danau, waduk, pantai, laut

Air sungai memiliki ciri khusus yaitu terdapat aliran dan tidak menggenang yang sangat berpengaruh terhadap distribusi Mikroorganisme yang ada. Aliran sungai ini mampu menghilangkan stratifikasi dan menghomogenkan karakteristik bakteri air sungai. Selain itu umumnya mempunyai jumlah Mikroorganisme yang besar dan beragam karena melimpahnya nutrisi yang terlarut di dalamnya. Air kolam, waduk atau danau memiliki air relatif tenang dan sedikitnya arus menyebabkan sedimentasi bahan terlarut air seperti tanah dan pasir. Endapan ini tentunya memiliki karakteristik Mikroorganisme yang cukup berbeda dengan badan air. Salah satu metode sederhana dalam pengambilan sampel air di lingkungan seperti di atas adalah hand dip method, prinsipnya yaitu:

- 1) Buka tutup botol lalu botol dimasukkan ke dalam air dengan posisi mulut botol kebawah. Mulut botol jangan sampai di pegang oleh tangan.
- 2) Celupkan botol sampai kedalaman tertentu biasanya minimal 6 inchi. Udara yang ada di dalam botol akan menekan dan mencegah

air masuk. Hal ini bertujuan untuk menghindari terambilnya sampel air yang berada dekat dengan permukaan.

- 3) Miringkan botol sehingga air perlahan masuk. Hadapkan mulut botol melawan arus atau buat aliran sendiri dengan mendorong botol horizontal berlawanan arah dengan tangan sehingga air masuk ke dalam botol.
- 4) Angkat botol ke permukaan lalu buang sedikit air yang terambil supaya terdapat ruang udara di dalam botol. Tutup dengan tutup botol kemudian kencangkan. Masukkan botol ke dalam plastik bersekat sebelum disimpan dalam freezer ice pack.



Gambar 15. ***Pengambilan sampel air sungai, air kolam, danau, waduk, pantai, laut***

Hal penting yang perlu diperhatikan dalam pengambilan sampel-sampel diatas adalah :

Jika sampel diambil dengan masuk ke dalam air:

- Jangan ambil di dekat permukaan atau dekat dengan dasar.
- Ambil berlawanan dengan arus air.
- Perhatikan sampah atau seresah yang mengambang, segmentasi dan kecepatan arus sungai.

- Ambil sampel ditengah sungai atau kolam, jika tidak memungkinkan maka sejauh mungkin dari tepian dengan mempertimbangkan faktor keamanan.
- Ambil dengan kedalaman antara 8-12 inchi, jika air yang tersedia umumnya kurang dari 4 inchi maka sebaiknya dicari sample point lain yang lebih dalam.
- Jika teknik ini dilakukan pada daerah tepi danau pantai sebaiknya diambil pada kedalaman 1 m.
- Berjalan melawan arus dan hati-hati dalam berjalan mengingat dapat teraduknya sedimen.
- Sebelum dilakukan pengambilan sampel sebaiknya diam sebentar untuk menunggu terendapnya sedimen yang terganggu dan aliran air normal kembali.
- Jika terdapat suatu anjungan atau dermaga maka akan mempermudah pengambilan sampel

Jika sampel diambil dengan kapal maka:

- Kedalaman pengambilan sampel harus lebih dari 1 m.
- Jangan buang jangkar, jika harus diturunkan maka jangkar diturunkan berlawanan sisi dengan sisi pengambilan sampel
- Matikan motor, diam sejenak sebelum pengambilan dilakukan.
- Bila membutuhkan pengambilan sampel pada kedalaman yang lebih dalam maka diperlukan peralatan khusus yang secara mekanis otomatis akan melepas tutup botol pada kedalaman tertentu. Peralatan yang umum digunakan untuk tujuan ini diantaranya adalah Zobell J-Z Sampler.

3. Sampel udara (*air sample*)

a. Komposisi umum mikroorganisme di udara

Kemungkinan lingkungan alami yang paling tidak bersahabat dengan mikroorganisme adalah lingkungan atmosfer. Sel mikroorganisme berukuran sangat kecil yang tersuspensi dalam udara dapat terancam kekeringan, rusak karena efek radiasi dari cahaya matahari ataupun dari aktivitas kimia gas oksigen. Banyak jenis bakteri

yang mati ketika terekspos ke udara terutama dari jenis gram negatif tetapi beberapa jenis mampu bertahan dan menggunakan turbulensi aliran udara untuk penyebarannya. Meskipun begitu tidak ada satu jenis pun yang mampu tumbuh dan berkembang biak dalam lingkungan atmosfer.

Flora bakteri utama yang mendominasi yaitu bakteri gram positif batang dan kokus yang sering menjadi pengontaminasi udara yang berasal dari binatang, manusia atau lingkungan air. Dari bakteri gram positif tersebut terdapat beberapa jenis yang sering dijumpai yaitu *Micrococci* dan *Corynebacteria* (koloni berpigmen), *Bacillus* (mampu membentuk endospora dan mempunyai bentuk koloni besar berwarna putih sampai krem), *Streptomyces* atau genus yang berhubungan dengan *Actinomycetes* (bakteri berfilamen dan koloni kecil dan timbul/raised)

Beberapa faktor yang menjadikan jenis-jenis ini mampu bertahan hidup adalah (1) Pigmentasi pada mikroorganisme dapat membantu melindungi dari radiasi cahaya tampak maupun UV, (2) Selubung dinding sel yang dimiliki oleh bakteri gram positif mampu mencegah kekeringan, (3) Pembentukan endospora dari *Bacillus* dan konidiospora dari *Actinomycetes* menjadikannya resisten terhadap radiasi dan kekeringan (Ray, 2005). Bahkan spora dari genus *Streptomyces* terspesialisasi untuk tersebar lewat udara karena spora kering tersebut terbentuk di ujung filamen berbentuk rantai dan siap disebarkan angin. Ketika berada di udara bakteri menjadi tidak aktif, mereka hanya melekat pada partikel debu. Penyebaran bakteri di udara juga sangat dipengaruhi oleh partikel-partikel/tetesan kecil air. Volume aerosol yang cukup ringan terbawa angin ini lebih besar dibandingkan dengan sel bakteri sehingga bakteri dapat mudah terlarut didalamnya dan tersebar di udara. Aerosol dapat terbentuk oleh kegiatan-kegiatan yang dapat memisahkan dan menyebarkan formasi air seperti batuk, bersin, semprotan air, cipratan air, gelembung udara di dalam air, dll.

Spora fungi dan sel yeast juga merupakan faktor pengontaminasi yang penting. Beberapa jenis umum jamur yang sering ditemukan dan yang bertanggung jawab terhadap pembusukan adalah *Aspergillus* dan *Penicillium*. Jenis ini tidak mempunyai mekanisme penyebaran spora secara aktif tetapi mereka memproduksi banyak spora kecil yang kering sehingga akan bertahan lama dari kekeringan dan radiasi. Beberapa fungi seperti *Fusarium* menghasilkan spora yang

umumnya tersebar saat keadaan udara lembab. Saat kelembaban udara (relative humidity) menurun seperti ketika pergantian malam ke siang, sporofor *Cladosporium* akan bereaksi dengan memelintir dan lepas sehingga tersebar ke udara dan menjadikannya jenis yang sering dijumpai di siang hari.

b. Faktor-faktor yang mempengaruhi keberadaan mikroorganisme di udara

Keberadaan mikroorganisme di udara dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu kelembaban udara, ukuran dan konsentrasi partikel debu, temperatur, aliran udara, jenis mikroorganisme. Semakin lembab (banyak uap dan partikel air) maka kemungkinan semakin banyak kandungan mikroorganisme di udara karena partikel air dapat memindahkan sel-sel yang berada di permukaan. Begitu juga dengan partikel debu, semakin tinggi konsentrasinya dan semakin kecil ukuran partikel debu maka semakin banyak jumlah mikroorganisme di udara. Jika suhu di suatu ruangan dinaikkan maka akan berdampak pada kekeringan di udara, tetapi perlu diperhatikan bahwa suhu tinggi dapat menaikkan suhu air sehingga memudahkan proses penguapan air. Aliran udara yang tinggi juga mampu mempercepat penguapan dan menerbangkan partikel debu. Pada umumnya keadaan udara yang kering dan mengandung sedikit debu memiliki konsentrasi mikroorganisme yang rendah. Selain itu jenis Mikroorganisme udara juga dipengaruhi oleh sumber-sumber pertumbuhan mikroorganisme. Lingkungan peternakan tentunya memiliki komposisi mikroorganisme udara yang berbeda dengan lingkungan rumah sakit atau lingkungan produksi minuman ringan. Kontaminasi mikroorganisme dari udara dapat dikurangi melalui beberapa usaha yaitu mengontrol partikel debu dengan menyaringnya, membuat udara positif dalam ruangan aseptik (udara positif dibuat dengan meninggikan tekanan di suatu ruang sehingga udara akan selalu mengalir ke tekanan yang lebih rendah), mengurangi kelembaban udara, dan memasang lampu UV.

Pengukuran konsentrasi mikroorganisme udara dalam suatu ruangan tertutup maupun terbuka harus memperhatikan beberapa hal penting berikut: aliran udara pernafasan, jendela dan pintu, letak dan sistem ventilasi, ada atau tidaknya sistem penyaringan, sirkulasi udara,

kecepatan angin, letak sumber bahan pengontaminan (sampah, saluran pembuangan, wastafel dll.), AC, tekanan udara dalam suatu ruang, jumlah orang/ lalu-lalang operator, adanya kayu atau bahan berpori. dll.

- c. Berbagai macam metode untuk mengambil sampel mikroorganisme di udara.

Berikut adalah beberapa macam metode yang diklasifikasikan berdasarkan prinsip kerjanya.

1. Metode non kultur (*non-culturable / non-vialbe air sample*)

spore trap

Dasar metode non kultur adalah dengan menjebak Mikroorganisme pada suatu alat kemudian mikororganisme yang terjebak dihitung secara langsung (saat itu juga tanpa inkubasi) dengan mikroskop. Dasar teknik ini adalah sama dengan metode impaction atau filtration yang akan dijelaskan kemudian. Cara ini hanya spesifik digunakan untuk menghitung spora jamur maka disebut juga jebakan spora (*spore trap*). Spora yang dihitung tidak memperdulikan apakah spora tersebut mampu untuk berkecambah atau tidak.

Beberapa jenis *spore trap* adalah Air-O-Cell, Allergenco, VersaTrap, Burkard, Cyclex, Cyclex-d, Micro-5 dll. Cara kerjanya adalah dengan menyedot udara memasuki alat lalu partikel yang terbawa akan ditumbukkan dengan substrat sampling yang lengket, kemudian sisa udara keluar lewat lubang. Spora yang menempel langsung dihitung dan diidentifikasi.

Kelebihan metode non kultur adalah :

- Mudah digunakan.
- Dapat membedakan jenis jamur secara cepat berdasarkan bentuk spora.
- Cepat dan dapat menghemat waktu (tanpa inkubasi).
- Tidak tergantung pada jenis media pertumbuhan yang cocok.

- Bisa juga untuk mendeteksi partikel udara lainnya seperti hifa, polen, fragmen epitel kulit dll.
- Cocok untuk menghitung spora yang dihubungkan dengan dampak alergi karena alergi dapat dipicu oleh spora hidup atau mati.

Kekurangan metode ini adalah :

- Tidak dapat membedakan jenis jamur lebih jauh atau lebih detail (misalnya morfologi spora *Aspergillus sp.* Dan *Penicillium sp.* umumnya sama).
- Tidak dapat membedakan spora yang mampu untuk tumbuh atau spora mati.
- Kurang cocok dipakai untuk mendeteksi sel vegetatif atau endospora bakteri.

2. Metode kultur (culturable / viable air sample)

Semua metode kultur menggunakan suatu media pertumbuhan dapat berupa agar dalam cawan petri atau agar strips untuk menumbuhkan mikroorganisme yang terjebak.

Kelebihan metode kultur adalah :

- Dapat digunakan untuk mendeteksi bakteri (tidak hanya spora saja).
- Memiliki gambaran berapa jumlah mikroorganisme hidup yang berada di udara.
- Dapat menentukan jenis mikroorganisme sampai spesies karena mempunyai koloni tunggal yang dapat dikultur lagi.

Kekurangannya adalah :

- Membutuhkan waktu inkubasi yang lama.
- Tidak begitu akurat mengingat spora yang rusak dan tidak mampu tumbuh tidak terhitung.

- Pertumbuhan jenis mikroorganisme tergantung jenis media yang digunakan sehingga mikroorganisme yang tidak mampu tumbuh pada media tersebut tidak akan terdeteksi.
- Jumlah total mikroorganisme mungkin dapat mengalami kesalahan karena koloni dapat bertindihan dan adanya perbedaan kecepatan pertumbuhan koloni.
- Pada umumnya dalam pengoperasiannya metode ini dapat memakan dana yang cukup besar.

a) Metode pasif

Disebut dengan metode pasif karena membiarkan partikel udara mengenai sendiri pada permukaan media pertumbuhan.

Exposure Plate

Cara pengambilan sampel metode exposure plate adalah dengan memaparkan cawan /settle plate (umumnya digunakan cawan $d=9$ cm) berisi media pertumbuhan non selektif ke udara terbuka selama waktu tertentu. Partikel udara yang mengendap karena gravitasi akan menempel pada permukaan agar. Pada umumnya cawan dibiarkan selama beberapa menit selanjutnya diinkubasi pada temperatur yang sesuai (misalnya 35°C untuk Total Count atau 25°C untuk Yeast and Mold). Exposure plate cocok digunakan pada ruangan tertutup yang aliran udaranya tenang. Metode ini bukan merupakan metode kuantitatif dan lebih berguna untuk mengetahui kecenderungan jumlah mikroorganisme di udara secara mudah dan murah. Cara ini bukan tergolong metode kuantitatif karena tidak dapat dihitung seberapa besar volume udara yang mengendap dan sangat tergantung kecepatan aliran udara dan diameter cawan yang dipakai. Selain kekurangan diatas, partikel udara yang sangat kecil dan tidak cukup berat untuk terendap menjadi tidak dapat terdeteksi dengan metode ini.

b) Metode aktif

Metode pengambilan udara secara aktif adalah dengan memaksa udara bergerak memasuki suatu pipa pada peralatan untuk menjebak

partikel yang terkandung didalamnya. Terdapat tiga prinsip dalam pengumpulan sampel udara secara aktif, yaitu:

Impingement

Dasar teknik ini adalah dengan menjebak partikel udara saat gelembung udara dilewatkan dalam cairan. Alat yang biasa digunakan adalah liquid impinger AGI-30 (ACE Glass, Vineland, NJ). AGI-30 umumnya beroperasi pada debit aliran 12,5 L/menit dengan 20 ml cairan pengumpul (0,1% pepton solution+ 0,1 ml anti-foam agent) selama 20 atau 30 menit. Pelarutan partikel udara dalam cairan terjadi ketika udara ditekan dan bertumbukan dengan permukaan cairan. Cairan pengumpul dapat berupa air steril atau media pertumbuhan (pepton) dan jika setelah selesai pengambilan sampel cairan ini dapat dikultur untuk menghitung mikroorganisme yang ada dengan metode yang tepat. Beberapa metode untuk mengkultur cairan tersebut adalah dengan mengambil 0,1 ml untuk spread plated dengan beberapa kali ulangan atau memakai metode filtrasi membran dengan ukuran sampel yang sesuai (Pepper dan Gerba, 2004). Jika waktu pengambilan diperpanjang maka akan memperbesar evaporasi cairan dan dapat menonaktifkan mikroorganisme yang telah terjebak. Pengenaan sel mikroorganisme ke dalam cairan dapat menyebabkan kerusakan sel dan hold time sampel yang lama akan menyediakan waktu yang cukup untuk mikroorganisme berkembang biak pada cairan pengumpul berupa media pertumbuhan. Kelebihan alat ini adalah murah, mudah digunakan, dan portable. Jika debit aliran udara tidak dapat ditentukan berdasarkan kecepatan pompa dan diameter pipa penyedot maka cara ini tidak tergolong cara pengambilan sampel kuantitatif karena satuannya tidak dapat ditentukan dengan jelas.

Efisiensi dari AGI-30 akan menurun tajam jika digunakan lebih dari 30 menit karena cairan pengumpul yang memiliki viskositas rendah dapat ter-evaporasi dengan mudah. Untuk mengurangi kelemahan ini telah dirancang alat biosampler dengan cairan pengumpul dari minyak berupa non-evaporating heavy white mineral oil (kekentalan lebih tinggi) yang mampu mengumpulkan udara selama 4 jam. Hal ini memberi keuntungan saat digunakan pada udara yang

memiliki sedikit partikel sehingga dibutuhkan volume sampel udara yang besar.

Sebaiknya pelaporan jumlah perhitungan mikroorganisme menggunakan AGI-30 memakai satuan CFU/m³. Menurut Pepper dan Gerba (2004), berdasarkan debit aliran udara sebesar 12,5L/menit maka perhitungannya menjadi:

$$\text{volume udara yang disedot} = 12,5 \text{ L/menit} \times \text{waktu pengambilan sampel (menit)}$$

$$\text{jumlah total mikroba yang diambil} = \text{jumlah hasil analisa (CFU/ml)} \times \text{volume cairan pengumpul}$$

$$\text{jumlah mikroba / L udara} = \frac{\text{jumlah total mikroba yang diambil}}{\text{volume udara yang disedot}}$$



Gambar 16. Metode pengambilan sampel mikroorganisme di udara dengan *Impingement*

Impaction

Dasar teknik impaction adalah dengan menempelkan partikel udara pada permukaan padat media dengan cara menumbukkannya. Udara masuk ke dalam alat dengan disedot oleh pompa lalu Teknik

ini biasanya menggunakan media agar padat sebagai substrat langsung penempelan partikel udara dan secara umum teknik impaction lebih banyak digunakan karena kelebihan tersebut.

Sieve impactor (six stage Andersen air sampler)

Udara yang masuk ke dalam alat Andersen air sampler (Anderson Instruments Inc., Smyra, GA) disedot oleh pompa udara (28,3 L/menit) sehingga udara mengalir dari atas ke bawah. Alat ini menggunakan 6 tingkatan tumbukan yang bisa memisahkan partikel berdasarkan ukurannya. Setiap tingkatan diisi oleh satu media pertumbuhan (27 ml) yang berada dalam cawan petri. Semakin tinggi tingkatannya (kebawah) lubang (setiap tingkat memiliki lubang berjumlah 400) tiap tingkatan akan semakin kecil (Maier et.al., 2000). Tumbukan yang terjadi pada Andersen sampler adalah dengan merubah aliran udara tangensial yang mendadak atau dengan menabrakkan partikel udara ke permukaan agar sehingga kelembaman pada partikel akan menjatuhkannya. Kemudian angin akan melewati pinggir cawan dan menuju tingkat selanjutnya. Kecepatan aliran udara yang terjadi semakin ke bawah semakin cepat sehingga secara bertahap partikel yang tertabrak dan menempel menjadi semakin kecil. Partikel udara yang besar akan terkumpul pada tingkat 1 dan partikel udara yang tidak memiliki potensial tumbukan yang cukup akan mengisi tingkat dibawahnya. Kecepatan tumbukan partikel udara pada permukaan agar sekitar 11 m/detik. Partikel udara yang di benturkan dengan kecepatan seperti ini memastikan bahwa partikel dengan ukuran lebih dari 1 μ m akan menempel. Oleh karena itu alat ini disebut juga sieve (ayakan) impactor karena kemampuan memisahkan ukuran partikel tersebut.

Setelah pengambilan sampel selesai, cawan dapat langsung diinkubasi tanpa perlakuan apapun. Perhitungan koloni pada tingkat 1 dan 2 dilakukan dengan mata telanjang atau jika terlalu penuh dilihat dengan mikroskop. Hasil hitungan pada tingkat 3-6 dihitung dengan metode yang sama atau dikonversikan dengan tabel konversi "*positive hole*" yang berfungsi sebagai pengoreksi berdasarkan teori probabilitas. Tabel konversi ini dibuat berdasarkan anggapan bahwa jumlah partikel yang bertumbukan dan menempel pada cawan selama proses

pengambilan sampel akan meningkat dan probabilitas beberapa partikel yang melewati lubang yang sama juga akan meningkat tapi kemungkinan/kesempatan partikel selanjutnya yang akan melewati lubang kosong (empty hole) atau lubang yang belum pernah terlewati partikel akan menurun. Misalnya ketika 9/10 lubang telah terlewati lebih dari 1 partikel maka partikel selanjutnya yang akan lewat memiliki 1 kemungkinan dari 10 kesempatan untuk melewati lubang yang belum dilewati (empty hole). Jadi rata-rata 10 tambahan partikel dibutuhkan untuk meningkatkan jumlah lubang yang terlewati (positive hole) sebanyak satu. Sebelum semua lubang menjadi positif, kemungkinan beberapa lubang bisa menerima beberapa partikel dalam sekali lewat. Tabel tersebut dikalkulasi dari rumus:

$$Pr = N \left[\frac{1}{N} + \frac{1}{N-1} + \frac{1}{N-2} + \dots + \frac{1}{N-r+1} \right]$$

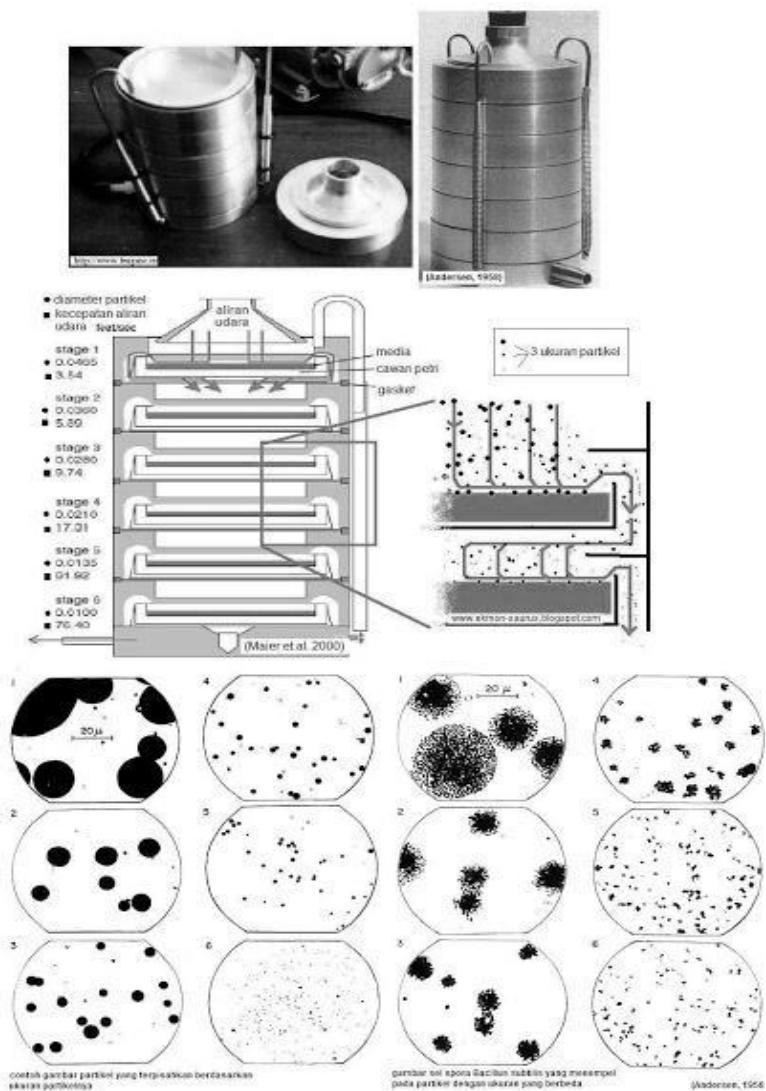
Pr = jumlah sebenarnya / total kemungkinan secara statistik

r = positive hole / koloni yang terhitung

N = jumlah total lubang tiap tingkat

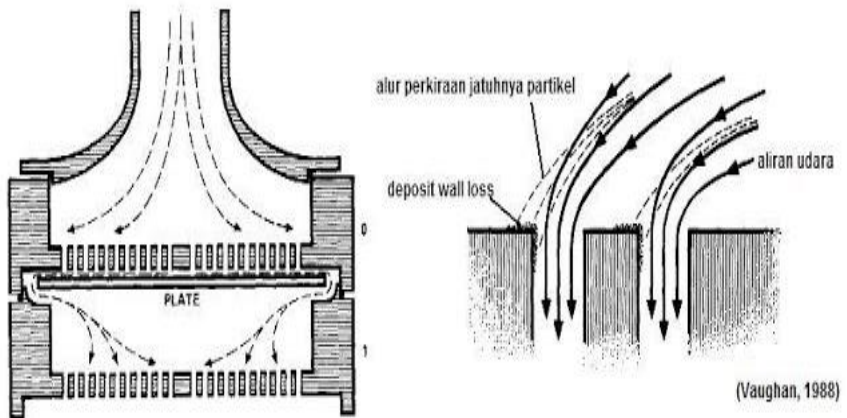
tabel konversi "positive hole" N = 400

r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr	r	Pr
1	1	51	54	101	116	151	189	201	279	251	394	301	557	551	856
2	2	52	56	102	118	152	191	202	281	252	397	302	561	552	864
3	3	53	57	103	119	153	193	203	283	253	400	303	565	553	863
4	4	54	58	104	120	154	194	204	285	254	402	304	569	554	861
5	5	55	59	105	122	155	196	205	287	255	405	305	573	555	870
6	6	56	60	106	123	156	197	206	289	256	408	306	578	556	879
7	7	57	61	107	124	157	199	207	291	257	411	307	582	557	888
8	8	58	63	108	126	158	201	208	293	258	413	308	586	558	897
9	9	59	64	109	127	159	202	209	295	259	416	309	591	559	907
10	10	60	65	110	128	160	204	210	297	260	419	310	595	560	917
11	11	61	66	111	130	161	206	211	299	261	422	311	599	561	927
12	12	62	67	112	131	162	207	212	301	262	425	312	604	562	937
13	13	63	68	113	133	163	209	213	304	263	428	313	608	563	947
14	14	64	70	114	134	164	211	214	306	264	431	314	613	564	958
15	15	65	71	115	135	165	212	215	308	265	433	315	618	565	969
16	16	66	72	116	137	166	214	216	310	266	436	316	622	566	981
17	17	67	73	117	138	167	216	217	312	267	439	317	627	567	992
18	18	68	74	118	140	168	218	218	314	268	442	318	632	568	1005
19	19	69	76	119	141	169	219	219	317	269	445	319	637	569	1017
20	20	70	77	120	142	170	221	220	319	270	449	320	642	570	1030
21	21	71	78	121	144	171	223	221	321	271	452	321	647	571	1043
22	22	72	79	122	145	172	224	222	323	272	455	322	652	572	1057
23	23	73	80	123	147	173	226	223	325	273	458	323	657	573	1071
24	24	74	82	124	148	174	228	224	328	274	461	324	662	574	1086
25	25	75	83	125	150	175	230	225	330	275	464	325	667	575	1102
26	26	76	84	126	151	176	232	226	332	276	467	326	673	576	1118
27	27	77	85	127	153	177	233	227	335	277	471	327	678	577	1134
28	28	78	87	128	154	178	235	228	337	278	474	328	684	578	1152
29	29	79	88	129	156	179	237	229	339	279	477	329	689	579	1170
30	30	80	89	130	157	180	239	230	342	280	480	330	695	580	1189
31	31	81	90	131	158	181	241	231	344	281	484	331	701	581	1209
32	32	82	92	132	160	182	242	232	346	282	487	332	706	582	1230
33	33	83	93	133	161	183	244	233	349	283	491	333	712	583	1252
34	34	84	94	134	163	184	246	234	351	284	494	334	718	584	1276
35	35	85	95	135	164	185	248	235	353	285	497	335	724	585	1301
36	36	86	97	136	166	186	250	236	356	286	501	336	730	586	1327
37	37	87	98	137	167	187	252	237	358	287	504	337	737	587	1356
38	38	88	99	138	169	188	254	238	361	288	508	338	743	588	1387
39	39	89	101	139	171	189	255	239	363	289	511	339	749	589	1420
40	40	90	102	140	172	190	257	240	366	290	515	340	756	590	1456
41	41	91	103	141	174	191	259	241	368	291	519	341	763	591	1496
42	42	92	104	142	175	192	261	242	371	292	522	342	769	592	1541
43	43	93	106	143	177	193	263	243	373	293	526	343	776	593	1591
44	44	94	107	144	178	194	265	244	376	294	530	344	783	594	1648
45	45	95	108	145	180	195	267	245	378	295	534	345	791	595	1715
46	46	96	110	146	181	196	269	246	381	296	537	346	798	596	1795
47	47	97	111	147	183	197	271	247	384	297	541	347	805	597	1895
48	48	98	112	148	185	198	273	248	386	298	545	348	813	598	2028
49	49	99	114	149	186	199	275	249	389	299	549	349	820	599	2228
50	50	100	115	150	188	200	277	250	391	300	553	350	828	600	2628



Gambar 17. Metode pengambilan sampel mikroorganisme di udara dengan *Impaction*

Selain itu terdapat suatu efek ‘kehilangan’ partikel karena menempel atau terjebak pada permukaan alat. Contohnya saat aliran udara menuju tingkat selanjutnya dibelokkan saat melewati antar sambungan dan dibelokkan lagi melewati lubang, sering dijumpai terdapat kumpulan partikel yang tersangkut pada lubang tersebut karena kelembaman partikel tidak mampu mengikuti alur udara yang dibelokkan. Kejadian ini dinamakan wall loss. Wall loss akan mengurangi efisiensi alat ini (Vaughan, 1988).



Gambar 18. Prinsip kerja alat Andersen sampler

Andersen sampler cocok digunakan untuk mengambil sampel dengan aliran udara yang cepat atau ukuran sampel yang besar seperti menghitung mikroorganisme udara pada ruang aseptis yang dimungkinkan memiliki sedikit jumlah mikroorganisme. Resiko yang ditimbulkan jika waktu pengambilan sampel terlalu lama adalah agar dapat pecah karena kekurangan air (air terevaporasi) dan meningkatkan resiko kematian sel karena sel kekeringan. Telah terbukti bahwa metode ini lebih efektif dibandingkan teknik impinger.

Secara komersial banyak variasi dan modifikasi berdasarkan prinsip Andersen air sampler yang beredar diantaranya adalah yang memiliki 8 tingkat, 2 tingkat atau hanya satu tingkat. Salah satunya adalah MAS 100 (MBV AG, Switzerland) yang terdiri dari satu tingkat

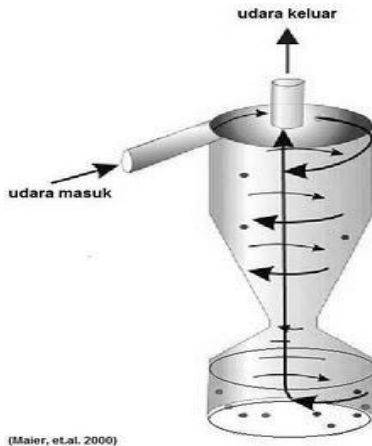
yang memiliki kecepatan 100 L/menit dan dapat menyedot sampai 2000 L setiap siklus. Hasil akhir koloni yang tumbuh tetap dikonversikan pada tabel konversi “positive hole”.



Gambar 19. Surface Air System

Salah satu alat sampling dari udara yang berprinsip sama dengan Andersen air sampler adalah SAS (Surface Air System) yang mampu menyedot udara dengan kecepatan 100L/menit. Beberapa varian SAS air sampler lainnya yaitu SAS Super 180 (180L/menit) dan Duo SAS 360 (360L/menit). untuk tipe Duo SAS 360 memiliki dua tutup (sampling head) sehingga dapat dilakukan pengambilan sampel untuk dua cawan petri sekaligus. Hal ini dapat digunakan untuk dua jenis media yang berbeda (misalnya media Total Count dan Yeast & Mold) atau untuk pengulangan sampling. Semua model SAS air sampler memiliki 401 lubang di setiap tutupnya (Bioscience).

Centrifugal impactor



Gambar 19. Centrifugal sampler

Centrifugal sampler menggunakan pola aliran melingkar udara untuk meningkatkan tarikan gravitasi dalam mendepositkan partikel udara yang disedot ke dalam alat. Alat yang umum memakai metode ini adalah Cyclone air sampler (pbi International) dan Coriolis air sampler (Bertin Technologies). Misalnya Cyclone air sampler mampu menyedot udara dengan kecepatan 1-1400 L/menit. Cara kerja pertama alat ini yaitu udara masuk ke dalam alat melalui pipa dengan sudut tertentu sehingga menimbulkan pola udara tangensial dan udara disedot oleh pompa pada pipa keluar. Udara masuk akan berputar pada permukaan corong sehingga dapat dipercepat seiring semakin kecilnya diameter pada corong. Percepatan ini menimbulkan gaya sentrifugal yang semakin besar sehingga sedimentasi partikel udara semakin mudah. Pendepositan partikel terjadi pada ujung corong yang terhubung pada wadah di bagian bawah berisi cairan pengumpul (collection liquid). Untuk menghitung mikroorganisme yang masuk ke dalam alat, maka cairan pelarut partikel dianalisa menggunakan metode yang sesuai. Dalam prakteknya alat yang menggunakan metode ini tidak mampu memisahkan ukuran partikel dan kurang efisien dalam menjebak partikel udara.

Alat air sampler lain yang menggunakan prinsip sentrifugasi untuk mengumpulkan partikel udara adalah RCS (Reuter Centrifugal Air Sampler) (Biotest AG, Dreieich). Berbeda dengan Cyclone, partikel yang tertekan akan menempel pada agar strip yang terletak melingkar pada sisi dalam sampling head kemudian setelah selesai agar strip dapat langsung diinkubasi. Agar strip memiliki 34 kotak dengan luas masing-masing 1 cm². Tersedia beberapa model RCS air sampler yaitu original/standard sampler (40L/menit), RCS plus (50L/menit) dan RCS High Flow (100L/menit) (Biotest).

Filtration

Metode ini menggunakan prinsip menyaring partikel udara berdasarkan ukurannya menggunakan kertas membran filter. Membran filter biasanya tersedia dalam kaset plastik sekali buang (Plastic Filter Cassettes) berdiameter 25, 37 atau 47 mm. Seperti halnya teknik membran filter untuk menyaring cairan, cara ini juga menggunakan tekanan negatif dari pompa (4 L/menit) untuk menekan udara menembus kertas membran yang terbuat dari polycarbonate atau cellulose acetate selama 30 menit.

Partikel udara yang berukuran lebih besar daripada pori membran akan tersaring. Keunggulan metode filtrasi adalah sangat akurat dalam menangkap partikel udara namun sangat tidak direkomendasikan untuk menghitung sel vegetatif bakteri karena kemungkinan besar sel akan mengalami kekeringan dan mati selama pengambilan sampel berlangsung. Oleh karena itu cara ini lebih tepat digunakan untuk mendeteksi spora jamur atau endospora bakteri yang resisten kekeringan. Setelah selesai pengambilan sampel, membran filter dapat dipindahkan kedalam media pertumbuhan lalu diinkubasi, dapat juga spora dihitung manual dengan bantuan mikroskop atau kertas membran dibilas dengan cairan pengekstrak (5 ml) selanjutnya dianalisa memakai metode yang sesuai. Pemilihan diameter membran filter juga berpengaruh terhadap perhitungan sel yang tertangkap. Untuk menghitung mikroorganisme dengan konsentrasi rendah maka sebaiknya menggunakan filter dengan diameter yang lebih kecil (luas permukaan lebih sempit sehingga meningkatkan densitas sel) untuk membantu menghitung sel di bawah mikroskop. Contoh air sampler

modern yang menggunakan teknik ini adalah Airport MD 8 (Sartorius, Goettingen, Germany). Airport MD 8 memiliki kecepatan mengambil udara yang dapat diatur yaitu 30, 40, 50 dan 125 L/menit dan menggunakan gelatine membrane filter. Keunggulan gelatine membrane filter dapat mengurangi kekurangan metode filtrasi dengan menjaga sel dari kekeringan saat pengambilan sampel yang lama karena gelatin tetap mempertahankan kelembabannya. Gelatine membrane filter juga memiliki sifat yang mudah larut sehingga saat ditempatkan diatas permukaan agar filter akan larut dan meninggalkan sel sehingga bersentuhan langsung dengan permukaan agar. Alat lainnya yaitu MD 8 Airstan (Sartorius, Goettingen, Germany). Prinsip kerjanya mirip dengan Airport MD8 tetapi mempunyai sampling head yang terpisah (dihubungkan dengan selang) dari alat utama. Hal ini dapat mempermudah saat mengambil sampel dengan titik sampling yang tinggi atau pada daerah tertentu yang kritis (Sartorius Stedim Biotech).

d. Kisaran hitung setiap air sampler

LOD (Limit of Detection)

LOD adalah jumlah minimum koloni yang dapat dibedakan dari ketidakadaan. Air sampler yang menggunakan metode kultur berhubungan erat dengan teknik plate count termasuk dengan nilai LOD-nya karena hasil perhitungan air sampler berada pada cawan atau agar strip. LOD untuk teknik plate count adalah 1CFU/plate. LOD pada air sampler sangat tergantung dari fungsi dan spesifikasi setiap alat dan metode seperti waktu pengambilan, kecepatan aliran udara, atau pengenceran yang dilakukan dll. Konsentrasi minimum koloni (LOD) air sampler dapat diikalkulasi dengan rumus berikut:

$$\frac{[(\text{LOD plate count} \times \text{jumlah total volume cairan}) / (\text{faktor pengenceran} \times \text{volume yang diplating})]}{(\text{waktu pengambilan sampel} \times \text{debit aliran udara})}$$

- *Liquid Impinger:*

Waktu pengambilan sampel = 30 menit

Volume cairan = 20 ml

Debit aliran udara = 12,5 L/menit

Volume sampel dengan teknik plate count = 0,1 ml (spread plate)

Tidak ada pengenceran yang dilakukan, maka:

$$= [(1 \times 20)/(0 \times 0,1)] / 30 \times 12,5$$

$$= 200 \text{ CFU} / 375 \text{ L}$$

$$= 200 \text{ CFU} / 0,375 \text{ m}^3$$

$$= 533 \text{ CFU} / \text{m}^3$$

= dibulatkan menjadi 500 CFU/ m³ (satu angka penting).

- *Filter cassette:*

Waktu pengambilan sampel = 30 menit

Volume cairan = 5 ml

Debit aliran udara = 4 L/menit

Volume sampel dengan teknik plate count = 1 ml (pour plate)

Tidak ada pengenceran yang dilakukan, maka:

$$= [(1 \times 5)/(0 \times 1)] / 30 \times 4$$

$$= 5 \text{ CFU} / 120 \text{ L}$$

$$= 5 \text{ CFU} / 0,12 \text{ m}^3$$

$$= 41,67 \text{ CFU} / \text{m}^3$$

= dibulatkan menjadi 40 CFU/ m³ (satu angka penting)

Jika analisa tidak menggunakan cairan pengekstraksi maka perhitungan akan berbeda.

- *Andersen 6 stage air sampler:*

Waktu pengambilan sampel maksimal secara umum = 5 menit

Volume cairan = tidak ada

Debit aliran udara = 28,3 L/menit

Volume sampel yang dianalisa dengan teknik plate count = tidak ada

Tidak ada pengenceran yang dilakukan, maka:

$$= [(1 \times -)/(- \times -)] / 5 \times 28,3$$

Batas pendeteksian tidak menjadi nol dibagi dengan volume udara yang disedot melainkan tetap 1 CFU/volume udara yang disedot karena menyesuaikan dengan LOD plate count.

$$= 1 \text{ CFU} / 141,5 \text{ L}$$

$$= 1 \text{ CFU} / 0,1415 \text{ m}^3$$

$$= 7,067 \text{ CFU} / \text{m}^3$$

= dibulatkan menjadi 10 CFU/ m³ (satu angka penting)

- *SAS air sampler*

SAS air sampler memiliki 3 varian yaitu SAS super 100 (100 L/menit), SAS super 180 (180 L/menit), duo SAS super 360 (360 L/menit) dan waktu pengambilan sampel yang direkomendasikan adalah 5 menit. Dengan perhitungan yang sama maka diperoleh LOD untuk masing-masing varian adalah SAS super 100 = $2\text{CFU}/\text{m}^3$, SAS super 180 = $1\text{CFU}/\text{m}^3$ dan Duo SAS super 360 = $1\text{CFU}/\text{m}^3$.

RCS air sampler; Tersedia dua model RCS air sampler yaitu original sampler (40L/menit) dan RCS plus (50L/menit). Waktu maksimal yang disarankan adalah 8 menit sehingga didapat nilai LOD untuk original sampler sebesar $3\text{CFU}/\text{m}^3$. RCS plus memiliki kemampuan dapat mengatur volume udara yang akan disedot mulai dari 1 L sampai 1000 L, untuk volume udara maksimal RCS plus maka didapat nilai LOD sebesar $1\text{CFU}/\text{m}^3$

MAS 100; MAS 100 memiliki kecepatan penyedotan sebesar 100 L/menit dan volume udara yang direkomendasikan adalah 1000 L sehingga mempunyai LOD sebesar $1\text{CFU}/\text{m}^3$.

Airport MD 8; Air sampler ini memiliki kecepatan tertinggi 125 L/menit dan volume udara maksimal yang disedot adalah 1000 L, maka memiliki LOD sebesar $1\text{CFU}/\text{m}^3$.

Jika udara yang diambilakan berkisar antara 500-1000 L dimungkinkan akan menghasilkan data yang tidak akurat karena beresiko mengurangi jumlah mikroorganisme yang diperoleh. Pengurangan ini disebabkan karena evaporasi sel yang terlalu lama sehingga mati kekeringan. Untuk alat lain yang belum diketahui nilai LOD, maka dapat dicari dengan jalan yang sama dengan perhitungan diatas.

LOQ (Limit of Quantification)

Setiap teknik memiliki batas minimum tersendiri supaya perhitungan yang dihasilkan terpercaya dan akurat secara statistik. LOQ adalah suatu batas jumlah koloni yang cukup/pantas untuk dapat dihitung dengan tingkat presisi dan akurasi yang dapat

diterima. Hal ini didasarkan pada grafik statistik Poisson supaya memiliki koefisien variasi sebesar 0,2. Teknik plate count mempunyai LOQ sebesar 30 CFU/plate yang menjadi dasar kalkulasi LOQ. Jadi untuk menentukan LOQ nilai LOD harus dikalikan 30 kali dengan hasil akhir memiliki satu angka penting..

- *Liquid Impinger*

LOQ plate count adalah 30 CFU/plate, Maka LOQ alat

= LOD alat x LOQ plate count

= 500CFU/m³ x 30

= 15.000 CFU/m³

= 20.000 CFU/m³ (satu angka penting)

Dengan perhitungan yang sama maka didapat LOQ tiap air sampler:

- Filter Cassette = 1000 CFU/m³
- Andersen 6 stage air sampler = 300 CFU/m³
- SAS air sampler = 60 CFU/m³ untuk SAS super 100 dan 30 CFU/m³ untuk SAS super 180
- RCS air sampler = 90 CFU/m³ untuk model original dan 30 CFU/m³ untuk RCS plus
- MAS 100 = 30 CFU/m³
- Airport MD 8 = 30 CFU/m³

e. Batas atas kisaran hitung (*UpperLimit*)

Batas atas kisaran hitung ditentukan berdasarkan jumlah maksimum koloni yang dapat tumbuh pada cawan. jumlah tersebut dibatasi supaya sesuai dengan jumlah yang diharapkan. Didalam istilah teknik plate count disebut TNTC (Too Numerous to Count) yaitu >300CFU/plate. Dengan dasar inilah batas atas dari setiap air sampler diketahui.

Liquid Impinger, Filter Cassette dan Airport MD 8

Batas atas spesifik untuk air sampler ini belum ditetapkan, tetapi kemungkinan besar sangat tinggi karena kedua metode ini memungkinkan untuk dilakukan pengenceran pada cairan pengekstrak atau filter sehingga didapatkan data yang sesuai dengan batas kisaran hitung plate count dalam satuan CFU/m³. Oleh karena itu cara ini cocok untuk mendeteksi mikroorganisme udara yang padat sampai 10.6CFU/m³.

RCS; RCS menggunakan agar strips untuk menjebak mikroorganisme lalu menumbuhkannya. Batas atas RCS sangat tergantung dengan penumbukan yang terjadi dan karakteristik koloni pada agar strip. Pada umumnya dipakai batas atas maksimum jumlah koloni yang tumbuh adalah 5 CFU/m² dan jumlah ini telah sesuai dengan 300 CFU/cawan (d=9cm). Faktor yang menentukan batas atas tidak hanya densitas koloni pada permukaan agar strips tetapi juga besarnya ukuran koloni juga perlu menjadi pertimbangan. Telah diketahui bahwa koloni dengan ukuran 2 mm untuk konsentrasi koloni permukaan 5CFU/m² dapat menimbulkan bias sebesar 10%, hal yang sama juga untuk koloni ukuran 1 mm memberikan bias sebesar 5%. Agar strips RCS memiliki ukuran 34 cm², debit aliran udara 40 L/menit dan batas waktu minimal (yang bisa diprogram) pengambilan sampel untuk RCS original adalah 0,5 menit, maka batas atas kisaran hitung menjadi 9000CFU/m³. Sedangkan untuk RCS plus yang mempunyai batas minimal pengambilan sampel sebesar 1 L, maka upper limit-nya menjadi 200.000CFU/m³.

Andersen 6 Stage Air Sampler; batas atas Andersen air sampler dipengaruhi oleh jumlah lubang yang terdapat pada tutup alat. Andersen 6 stage air sampler memiliki 400 lubang setiap tingkat sedangkan Andersen 2 stage air sampler hanya 200 lubang per tingkat. Tumbukan partikel yang terjadi tidak acak seperti hanya pada RCS air sampler namun sangat dikontrol oleh letak dan jumlah lubang. Untuk meminimallisasi koloni yang saling bertindihan maka sebaiknya koloni dihitung sebelum memiliki ukuran lebih besar dari jarak antar lubang. Jarak antar lubang ini bervariasi antara 1-3 mm dan berbeda untuk setiap tipe. Dengan mengasumsikan bahwa koloni yang overlap dapat

diminimalisasi, pertimbangan penting lainnya juga ditujukan untuk faktor kemungkinan beberapa partikel melewati lubang yang sama dan menabrak pada tempat yang sama. Untuk menghitung batas atas berdasarkan sebab diatas, table positive hole dapat lebih menggambarkan nilainya dibandingkan dengan penentuan CFU. Jika secara acak satu koloni tumbuh pada satu lubang maka untuk 400 lubang berdasarkan tabel positive hole menjadi 2628. Jadi untuk waktu pengambilan sampel minimum 1 menit dan debit 28,3L/menit, maka batas atas air sampler ini adalah 100.000 CFU/m³.

SAS air sampler; semua model SAS air sampler memiliki 401 lubang di setiap tutupnya. Penentuan upper limit air sampler ini mirip dengan Andersen air sampler dan perlu dikonversi pada tabel positive hole yang tersedia dari manual alat ini. Untuk tipe super 100 dan 180 maka batas atasnya sebesar 80.000 CFU/m³ untuk volume sampling yang direkomendasikan 10 L.

f. Berbagai pertimbangan pemilihan air sampler

Pembahasan ini akan mengulas tentang pertimbangan memilih air sampler yang menggunakan metode aktif dan pada umumnya berharga tidak murah. Selain faktor yang akan dijelaskan kemudian, tentunya kita harus memahami prinsip dasar metode yang cocok (telah diuraikan diatas). Berikut adalah beberapa kemampuan yang perlu dibandingkan dan disesuaikan dengan kebutuhan penggunaannya:

volume sampling yang bisa diatur; fasilitas ini sudah menjadi kemampuan umum air sampler modern. Volume sampling yang dipilih sebaiknya disesuaikan dengan persyaratan organisasi tertentu atau suatu perusahaan, misalnya peraturan internasional mensyaratkan pengambilan sampel udara untuk mikrobiologi sebesar 1 m³ sehingga dipilih alat yang mampu menyedot sampai volume udara sebanyak itu. Beberapa jenis alat juga telah dilengkapi dengan berbagai pilihan volume udara, baik liter ataupun meter kubik.

baterai rechargeable; Perlu dipertimbangkan masa pakai alat berdasarkan ketahanan baterainya. Semakin efisien baterai maka semakin baik maksimal dalam penggunaannya.

pemilihan format media pada air sampler; yang dimaksud format media adalah apakah alat itu menggunakan media dalam bentuk cawan, agar strips atau cassette. Media agar strips dan cassette (steril) biasanya harganya relatif lebih mahal daripada media yang diracik sendiri lalu dituang pada cawan dan selalu disediakan oleh supplier secara langsung. Jika frekuensi pengambilan sampel sangat tinggi tentunya media dalam cawan dapat menghemat dana secara signifikan.

kemampuan penundaan waktu pengambilan sampel (delay time) atau pengaktifasian dengan remote; delay time (penundaan waktu pengambilan sampel) berguna untuk mengurangi resiko kontaminasi dari operator saat meletakkan alat sehingga operator memiliki cukup waktu untuk menjauh dari air sampler. Pengaktifasian alat dari jarak jauh menggunakan remote juga memiliki tujuan yang sama. Namun tidak semua alat mempunyai kemampuan ini.

akurasi debit udara yang disedot; akurasi debit udara berbeda-beda pada setiap alat dan tergantung oleh pabrik pembuatannya. Spesifikasi akurasi umumnya berkisar antara $\pm 2,5\%$ sampai $\pm 10\%$ dari volume udara yang disedot. Jika untuk menganalisa kandungan mikroorganisme udara pada ruang steril maka akurasi ini menjadi sangat penting karena hilangnya udara yang tidak tersedot (jika mengandung mikroorganisme) dapat memberikan perbedaan signifikan pada hasil yang didapat.

Kalibrasi; semua pabrikan biasanya menyediakan sertifikat kalibrasi dan menawarkan macam-macam program perawatan. Kalibrasi dilakukan minimal sekali dalam setahun. Beberapa pabrikan menjual alat sistem kalibrasi sehingga pembeli dapat mengkalibrasi sendiri. Hal ini dapat sangat berguna jika pembeli memiliki banyak alat air sampler dan juga dapat menghemat biaya pengeluaran untuk kalibrasi di luar.

D. Masa tahan sampel (sample hold time) dan penyimpanan sampel

Setelah sampel diambil dari sumbernya sampel harus dianalisa langsung atau sesegera mungkin di laboratorium. Jika hal ini tidak memungkinkan maka ada suatu batas toleransi yang diperbolehkan. Batas ini ditentukan untuk mencegah sampel menjadi bias sehingga data yang dihasilkan tidak akurat. Bila sampel dianalisa melebihi batas sample hold time maka dikhawatirkan jumlah bakteri tertentu akan bertambah karena nutrisi atau berkurang karena alasan lain. Pada umumnya untuk jenis sampel umum air yang dapat tidak dapat diminum (non potable water) mempunyai masa tahan sampel 6 jam sedangkan air yang dapat diminum (potable water) masih layak dianalisa sebelum 30 jam. Namun untuk lebih spesifik berdasarkan tujuannya, sampel air untuk diuji HPC (Heterotrophic Plate Count) sebaiknya dianalisa sebelum 24 jam, untuk total *coliform* dan *E. coli* dianalisa sebelum 48 jam (potable water) dan 30 jam (waste water). Tidak ada suatu perbedaan yang signifikan antara sampel yang diuji langsung setelah analisa atau sampel yang diuji pada batas masa tahan sampel yang dipersyaratkan.

Dalam kurun waktu masa tahan sampel tersebut sampel sebaiknya disimpan dalam suatu kondisi yang mencegah karakteristik bakteri pada sampel berubah, seperti jumlah dan jenis bakteri. Kondisi yang cocok untuk menonaktifkan bakteri adalah suhu dingin. Suhu dingin dapat memperlambat aktivitas metabolisme bakteri namun tidak merusak enzim dan komponen sel lainnya. Sampel umum dapat disimpan pada suhu 2-8°C, jangan simpan sampel pada suhu beku karena kristal es akan merusak sel. Botol sampel yang telah dimasukkan plastik bersekat dapat dimasukkan ke dalam Freezer ice pack atau cooler yang berisi es.

E. Perlakuan pada sampel sebelum diuji

Perlakuan ini dapat berupa penambahan suatu senyawa yang menghambat kerja zat yang mampu mematikan bakteri yang berada di dalam sampel. Jika zat ini dapat dinetralisir maka selama sample hold times jumlah bakteri tidak akan berkurang karena aktivitas zat tersebut.

Pada sampel air yang mengandung chlorine, sampel dapat ditambah agen deklorinasi berupa sodium thiosulphate($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dengan konsentrasi 100 mg/L, misalnya dalam sampel botol 120ml ditambahkan 0,1 ml larutan 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (konsentrasi ini akan menetralkan +/- 15mg/L residu chlorin dan dipakai pada sampel air limbah). Sedangkan sodium thiosulphate yang ditambahkan untuk sampel air minum adalah 0,1 ml larutan 3% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (konsentrasi ini akan menetralkan +/- 5mg/L). Sodium thiosulphate juga mampu untuk mereduksi halogen lain selain chlorine.

Jika sampel mengandung konsentrasi logam tinggi seperti copper atau zinc (>1mg/L), maka dapat diberikan 372mg/L disodium salt of EDTA (ethidium diamine tetra acetic acid), caranya adalah tambahkan 0,3ml 14% EDTA pH 6,5 untuk 120ml botol sebelum botol disterilisasi. Cara ini juga dapat dikombinasikan dengan penambahan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ bila perlu. Selain kedua cara diatas, netralisasi beberapa substansi antimikroba lainnya dengan senyawa yang tepat yaitu:

- Glutaraldehyde dapat dinetralkan oleh sodium hydrogen sulphite
- Aldehyde dapat dinetralkan oleh glycine
- Quaternary ammonium compound dapat dinetralkan oleh polysorbate

Jika tidak menemukan senyawa yang tepat untuk menghilangkan aktivitas zat antimikroba tertentu pada sampel maka diasumsikan kegagalan dalam mengisolasi bakteri disebabkan oleh zat antimikroba tersebut. Namun perlu diingat, bakteri yang mampu cukup lama bertahan pada lingkungan yang mengandung zat antimikroba (yang biasanya akan terambil) adalah jenis bakteri yang dimungkinkan mampu bertahan.

BAB VI TEKNIK PLATE COUNT (HITUNGAN CAWAN)

Teknik *Plate Count* (Hitungan cawan) lebih lazim digunakan dalam pemeriksaan produk karena dianggap paling sederhana dibandingkan dengan metode MPN dan metode hitungan mikroskopik langsung maupun metode turbidimetri. Metode ini bertujuan untuk menetapkan angka mikroorganisme (bakteri, kapang dan khamir) aerob mesofil yang terdapat di dalam produk tertentu. Adapun cara-cara penghitungan dengan metode hitungan cawan sebagai berikut:

Pengenceran

Bahan pangan yang diperkirakan mengandung lebih dari 300 mikroorganisme per ml per g, atau per cm permukaan, memerlukan perlakuan pengenceran, sebelum ditumbuhkan pada medium agar di dalam cawan petri, sehingga setelah inkubasi akan terbentuk koloni pada cawan tersebut dalam jumlah yang dapat dihitung, dimana jumlah yang terbaik adalah di antara 30-300. Pengenceran biasanya dilakukan secara desimal yaitu 1:10, 1:100, 1:100 dan seterusnya, sebagaimana pada gambar 4.1.

Pengambilan sampel dilakukan secara aseptik dan pada setiap pengenceran dilakukan pengocokan kira-kira sebanyak 25 kali untuk memisahkan sel-sel mikroorganisme yang bergabung menjadi satu. Untuk mengetahui jumlah mikroorganisme pada permukaan luar bahan pangan, misalnya daging sapi, ayam atau ikan, pengambilan sampel dapat dilakukan dengan menggunakan metode usap (swab).

Larutan yang digunakan untuk pengenceran dapat berupa larutan fosfat bufer, larutan garam fisiologi 0,85% atau larutan Ringer. Untuk bahan pangan yang sukar larut ke dalam larutan pengenceran pertama dapat ditambahkan pasir putih atau butir-butir gelas (*glass beads*) yang disterilisasi bersama dengan larutan pengencer tersebut. Misalnya jika contoh yang akan dianalisis adalah tepung atau pati, digunakan satu sendok pasir ke dalam 90 atau 99 ml larutan

pengencer pertama, sehingga sewaktu dikocok pemecahan partikel-partikel tepung atau pati akan lebih mudah. Butir-butir gelas digunakan jika akan menganalisis total mikroorganisme dari telur, sehingga bagian yang bersifat koloid pada telur dapat lebih mudah dipecahkan.

Cara Pembiakan

Prinsip metode hitungan cawan adalah sebagai berikut: Jika sel mikroorganisme masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka sel mikroorganisme akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan menggunakan mata tanpa menggunakan mikroskop. Metode hitung cawan merupakan cara yang paling sensitif untuk menghitung jumlah mikroorganisme karena alasan-alasan sebagai berikut:

- Hanya sel yang masih hidup yang dihitung
- Beberapa jenis mikroorganisme dapat dihitung sekaligus
- Dapat digunakan untuk isolasi dan identifikasi mikroorganisme karena koloni yang terbentuk mungkin berasal dari satu sel mikroorganisme dengan penampakan pertumbuhan spesifik.

Selain keuntungan-keuntungan tersebut, metode hitungan cawan juga mempunyai kelemahan-kelemahan sebagai berikut:

- Hasil perhitungan tidak menunjukkan jumlah sel mikroorganisme yang sebenarnya, karena beberapa sel yang berdekatan mungkin membentuk satu koloni.
- Medium dan kondisi yang berbeda mungkin saja menghasilkan nilai yang berbeda.
- Mikroorganisme yang ditumbuhkan harus dapat tumbuh pada medium padat dan membentuk koloni yang kompak dan jelas, tidak menyebar.
- Memerlukan persiapan dan waktu inkubasi 1-2 hari sehingga pertumbuhan koloni dapat dihitung.

Metode hitungan cawan dapat dibedakan atas dua cara yaitu:

(1) metode tuang (*pour plate*) dan (2) metode permukaan (*spread plate*).

A. Metode Tuang (*Pour Plate*)

Dari pengenceran yang dikehendaki, sebanyak 1 ml atau 0,1 ml larutan sampel yang telah diencerkan dipipet ke dalam cawan petri menggunakan pipet 1 ml atau 1,1 ml. Sebaiknya waktu antara dimulainya pengenceran sampai menuangkan ke dalam cawan petri tidak boleh lebih dari 30 menit. Kemudian ke dalam cawan tersebut dimasukkan agar medium agar cair steril yang telah didinginkan hingga 50°C sebanyak kira-kira 15 ml. Selama penuangan medium, tutup cawan petri tidak boleh dibuka terlalu lebar untuk menghindari kontaminasi dari luar. Segera setelah penuangan, cawan petri digerakkan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel-sel mikroorganisme secara merata, yaitu dengan gerakan melingkar atau gerakan seperti angka delapan. Setelah medium agar memadat, cawan-cawan tersebut dapat diinkubasikan di dalam inkubator dengan posisi terbalik.

Inkubasi dilakukan pada suhu dan waktu tertentu sesuai dengan jenis mikroorganisme yang akan dihitung. Medium agar yang juga disesuaikan dengan jenis mikroorganisme yang akan ditumbuhkan. Selama inkubasi, sel-sel yang masih hidup akan tumbuh dan membentuk koloni yang dapat terlihat langsung oleh mata.

Setelah masa inkubasi berakhir, koloni yang terbentuk dihitung. Setiap koloni dianggap berasal dari satu sel yang membelah menjadi banyak sel, meskipun mungkin juga berasal dari lebih dari satu sel yang letaknya berdekatan. Perhitungan jumlah koloni dapat dilakukan dengan menggunakan alat bantu hitung "*quebec Colony Counter*". Ketelitian akan lebih tinggi jika dilakukan secara duplo, yaitu menggunakan dua cawan petri untuk setiap pengenceran, bahkan apabila beberapa kasus dilakukan triplo untuk ketelitian yang lebih tinggi lagi.

B. Metode Permukaan (*Spread Plate*)

Pada metode ini, agar memperoleh kondisi steril maka terlebih dahulu dituangkan ke dalam cawan petri steril dan dibiarkan membeku. Setelah membeku dengan sempurna, sebanyak 0,1 ml sampel yang telah diencerkan dipipet pada permukaan agar tersebut, kemudian disebar dengan batang gelas bengkok (*Hockey Stick*) yang terlebih dahulu dicelupkan ke dalam alkohol 95% dan dipijarkan hingga alkoholnya habis terbakar dan dingin. Selanjutnya inkubasi dilakukan seperti pada metode tuang. Tapi yang menjadi catatan bahwa jumlah sampel yang ditumbuhkan hanya 0,1 ml, tidak boleh 1 ml, sehingga harus dimasukkan ke dalam perhitungan pengenceran untuk mendapatkan “*Total Count*”.

C. Cara Menghitung Koloni

Perhitungan jumlah koloni akan lebih muda dan cepat jika pengenceran dilakukan secara desimal. Sebagai contohnya misalnya penetapan jumlah mikroorganisme pada air minum isi ulang. Pengenceran awal 1 : 10 ($= 10^{-1}$) dibuat dengan cara mengencerkan 1 ml sampel air minum ke dalam 9 ml larutan pengencer, dilanjutkan dengan pengenceran yang lebih tinggi, misalnya sampai 10^{-3} . Jika setelah inkubasi misalnya diperoleh 60 dan 64 koloni masing-masing pada cawan duplo yang mengandung sampel dengan pengenceran 10^{-4} , maka jumlah koloni dapat dihitung sebagai berikut (1 ml larutan pengencer dianggap mempunyai berat 1 g):

$$\begin{aligned}\text{Faktor pengenceran} &= \text{Pengenceran} \times \text{Jumlah sampel} \\ &= 10^{-4} \times 1 \\ &= 10^{-4} \\ \text{Jumlah koloni} &= \text{Jumlah koloni} \times 1/\text{Fa} \\ &= (60 + 64)/2 \times 1/10^{-4} \\ &= 6,2 \times 10^5\end{aligned}$$

D. Standar Penghitungan

Untuk melaporkan suatu hasil analisis mikrobiologi digunakan suatu “*Standar Plate Count*” (SPC) yang menjelaskan mengenai cara menghitung koloni pada cawan serta cara memilih data yang ada untuk menghitung jumlah koloni di dalam suatu sampel. Cara menghitung koloni pada cawan adalah sebagai berikut:

1. Cawan yang dipilih dan dihitung adalah yang mengandung jumlah koloni antara 30 – 300.
2. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan satu kumpulan koloni yang besar dimana jumlah koloninya diragukan sehingga dapat dihitung sebagai satu koloni.
3. Suatu deretan (rantai) koloni yang terlihat sebagai suatu garis tebal dihitung sebagai satu koloni.

Data yang dilaporkan sebagai SPC harus mengikuti kaidah-kaidah sebagai berikut:

1. Hasil yang dilaporkan hanya terdiri dari dua angka yaitu angka pertama di depan koma dan angka kedua dibelakang koma. Jika angka yang ketiga sama dengan atau lebih besar dari 5, harus dibulatkan satu angka lebih tinggi pada angka yang kedua.

Jumlah koloni per pengenceran			Standart Plate Count	Keterangan
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
<u>234</u>	28	1	2,3 x 10 ³	28 dan 1 < 30
700	<u>125</u>	10	1,3 x 10 ⁴	700 > 300; 10 < 30
TBUD	TBUD	<u>197</u>	2,0 x 10 ⁵	TBUD > 300

*TBUD = Terlalu Banyak untuk dihitung

2. Jika semua pengenceran yang dibuat untuk pembiakan menghasilkan angka kurang dari 30 koloni pada petri, hanya jumlah koloni pada ***pengenceran yang terendah*** yang dihitung. Hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya

pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

Jumlah koloni per pengenceran			Standart Plate Count	Keterangan
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
<u>16</u>	1	0	< 30 x 10 ² (1,6 x 10 ²)	Hitung pengenceran 10 ⁻¹

- Jika semua pengenceran yang di dibuat untuk pembiakan menghasilkan angka lebih dari 300 koloni pada petri, hanya jumlah koloni pada ***pengenceran yang tertinggi*** yang dihitung, misalnya dengan cara menghitung jumlahnya pada ¼ bagian cawan petri, kemudian dikalikan 4. hasilnya dilaporkan sebagai lebih dari 300 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

Jumlah koloni per pengenceran			Standart Plate Count	Keterangan
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
TBUD	TBUD	<u>355</u>	> 3,0 x 10 ⁵ (3,6 x 10 ⁵)	Hitung pengenceran 10 ⁻³
TBUD	<u>325</u>	20	> 3,0 x 10 ⁴ (3,3 x 10 ⁴)	Hitung pengenceran 10 ⁻³

- Jika cawan dari dua tingkat pengenceran menghasilkan koloni dengan jumlah antara 30 dan 300, dan perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah dari kedua pengenceran tersebut lebih kecil atau sama dengan 2, maka tentukan rata-rata dari kedua nilai tersebut dengan memperhitungkan pengencerannya. Jika perbandingan antara hasil tertinggi dan terendah lebih besar dari 2, yang dilaporkan hanya ***hasil yang terkecil***.

Jumlah koloni per pengenceran			Standart Plate Count	Keterangan
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
<u>293</u>	41	4	1,7 x 10 ³	Hitung rata-ratanya karenaa 41000/29300 = 1,4 (< 2) Hitung pengenceran 10 ⁻¹ karena 32000/14000 = 2,3 (>2)
<u>140</u>	32	2	1,4 x 10 ³	

5. Jika digunakan dua cawan petri (duplo) per pengenceran, data yang diambil harus dari kedua cawan tersebut, tidak boleh hanya diambil dari salah satunya, meskipun salah satu dari cawan duplo tersebut tidak memenuhi syarat antara 30-300.

Jumlah koloni per pengenceran			Standart Plate Count	Keterangan
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
<u>175</u>	16	1	1,9 x 10 ³	Rerata dari pengenceran 10 ⁻¹
<u>208</u>	17	0		

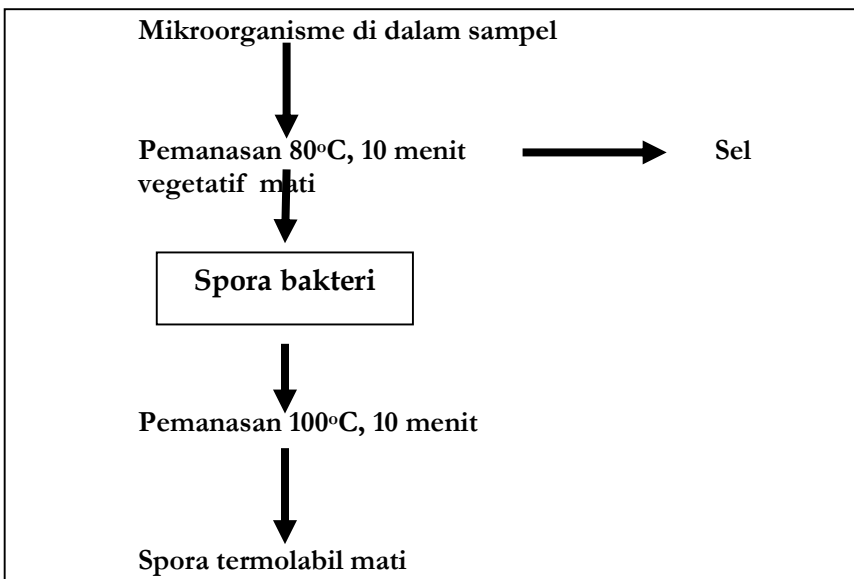
Jumlah koloni per pengenceran			Standart Plate Count	Keterangan
10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³		
<u>138</u>	42	2	1,5 x 10 ³	Rerata dari pengenceran 10 ⁻¹ , karena perbandingan antara pengenceran 10 ⁻² dan 10 ⁻³ adalah 2,4
<u>162</u>	43	4		
<u>290</u>	36	4	3,1 x 10 ³	Rerata dari pengenceran 10 ⁻¹ dan 10 ⁻² karena perbandingan antara kedua pengenceran adalah 1,2.
<u>280</u>	32	1		
<u>291</u>	25	3	3,0 x 10 ³	Rerata dari pengenceran 10 ⁻¹ , meskipun 305 > 300 (angka yang lain < 30).
<u>305</u>	27	0		

E. Penghitungan total Bakteri

Untuk menghitung jumlah total bakteri dengan metode hitungan cawan digunakan Nutrien Agar (NA) atau Plate Count Agar (PCA). Medium ini baik digunakan untuk pertumbuhan bakteri, tetapi kapang dan khamir tidak tumbuh optimum.

F. Penghitungan total spora bakteri

Untuk menghitung jumlah spora bakteri pada contoh makanan, suspensi contoh harus dipanaskan terlebih dahulu untuk membunuh sel vegetatif bakteri, kapang dan khamir maupun spora kapang dan khamir. Jumlah spora bakteri di dalam contoh dapat dihitung menggunakan metode hitungan cawan setelah contoh dipanaskan pada suhu 80°C selama 10 menit. Jika yang akan dihitung hanya spora yang tahan panas (*termoresistan*), termasuk termofil, pemanasan dilakukan pada suhu yang lebih tinggi yaitu 100°C selama 10 menit (gambar 4.2). Medium yang digunakan untuk spora aerobik adalah Nutrien Agar, sedangkan untuk spora anaerobik dapat digunakan medium *Chopped Meat Medium*.



G. Penghitungan total Kapang-Khamir

Jumlah kapang dan khamir pada sampel makanan dapat dihitung dengan metode hitungan cawan menggunakan medium *Potato Dekstroza Agar* (PDA). Jika di dalam sampel diduga juga mengandung bakteri dalam jumlah tinggi, maka pertumbuhan bakteri dapat dihambat dengan menambahkan 1 ml HCl 10% steril ke dalam 100 ml PDA yang telah disterilasi.

PDA merupakan suatu medium yang mengandung sumber karbohidrat dalam jumlah cukup, sehingga baik untuk pertumbuhan kapang dan khamir tetapi kurang baik untuk pertumbuhan bakteri. Akan tetapi juga memfermentasikan karbohidrat dan menggunakannya sebagai sumber energi, maka beberapa bakteri masih mungkin tumbuh pada medium PDA. Dengan menurunkan pH medium pertumbuhan bakteri akan terhambat karena pada umumnya bakteri tidak dapat tumbuh pada pH yang kurang dari 4,0. PDA yang telah diasamkan tersebut disebut *Acidified Potato Dextrose Agar*.

Saran Teknis Metode Plate Count untuk Pemula

Salah satu teknik dasar mikrobiologi yang sangat familiar adalah teknik penanaman dan menginokulasikan mikroorganisme pada cawan petri yang umumnya meliputi preparasi sampel, pengenceran bertingkat/serial dilution, penanaman pada cawan baik memakai cara spread plate, pour plate, inkubasi dan menghitung koloni. Untuk meningkatkannya maka secara keseluruhan disebut dengan teknik plate count (hitungan cawan) karena sering digunakan untuk enumerasi. Artikel ini ditujukan untuk pemula yang tahu teori plate count namun belum begitu banyak mencoba dalam praktek sehingga membutuhkan cara-cara yang dapat meminimalisasi kesalahan dan tidak mengulangi analisa karena hasil perhitungan tidak representatif. Persyaratan-persyaratan prosedural berdasarkan standar internasional tervalidasi ini bertujuan untuk meningkatkan keakurasian dan ketelitian kerja. Jika semua saran dilakukan maka kemungkinan untuk mendapatkan angka koloni yang baik dengan tingkat kepercayaan analisa yang tinggi akan semakin besar diperoleh. Jadi persyaratan teknis yang dibatasi dalam

bentuk angka ini adalah kondisi paling ideal yang sebaiknya dilakukan. Namun setiap saran adalah pilihan yang mempunyai konsekuensi tersendiri dalam aplikasinya dan semua kembali kepada analis untuk menentukan teknik analisa yang disesuaikan dengan kebutuhan dan ketersediaan alat yang ada sehingga tercapai keseimbangan antara kualitas analisa dan kuantitas biaya yang dikeluarkan.

Saran umum

1. Area kerja bersih, bebas debu, berventilasi dan dengan pencahayaan 1000 lux (setara dengan 100 lilin). Area kerja memiliki densitas mikroorganisme tidak lebih dari 160 koloni/m² selama pemaparan 15 menit (15 koloni/cawan selama 15 menit) (FDA BAM).
2. Sebaiknya menggunakan Laminar Air Flow kelas II (Class II vertical flow cabinet). Lampu UV (254 nm) pada Laminar air flow diharapkan mampu membunuh 99% koloni pada cawan yang diinokulasikan 200-300 koloni/cawan (APHA).

Preparasi sampel (terutama untuk sampel padat)

1. Sampel disimpan dalam refrigerator 0-5°C dan dianalisa tidak lebih dari 24 jam.
2. Sampel beku dicairkan secara bertahap pada suhu 2-8°C selama 18 jam. Jika pencairan secara cepat diperlukan maka cairkan dalam air dingin selama 1-2 jam (USDA/FSIS) atau waterbath pada suhu 45°C tidak lebih dari 15 menit sambil diaduk (FDA BAM).
3. Jika sampel terdapat dalam kemasan plastik maka saat pengambilan sampel kemasan disemprot dengan alkohol 70% lalu biarkan kering dan jika sampel terdapat dalam kemasan botol maka untuk mengambil sampel botol dicelupkan ke dalam alkohol 70% sedalam 3,5 cm dari leher botol kemudian dibiarkan kering.
4. Pisahkan sampel daging dan non-daging baik dalam penyimpanan atau dalam analisa
5. Untuk menghancurkan sampel dengan sempurna gunakan blender atau mixer yang memiliki 4 pisau putar stainless steel tajam dengan putaran 10.000-12.000 rpm dan juga wadah bertutup berukuran 1000 ml, lalu penghancuran dilakukan selama

2 menit, pertama tama mulai dengan kecepatan rendah lalu ke kecepatan tinggi dalam beberapa detik. Tunggu 2-3 menit sampai busa yang terbentuk menghilang (FDA BAM). Cara lainnya menggunakan stomacher yaitu sampel dalam plastik steril dihimpit berkali-kali oleh lempengan pedal, tetapi hasilnya tidak lebih halus dibandingkan dengan blender.

6. Timbangan analitik yang dipakai harus memiliki ketelitian 0,1 g dengan kapasitas ≥ 2000 g (AOAC).
7. Jika volume sampel air penuh sampai leher botol maka buang sebagian air untuk memberi ruang pengocokan (minimal 2,5 cm atau +/- 1 inchi dari tutup botol) (USDA/FSIS).
8. Jika sampel beku maka lebih baik ditimbang dalam keadaan beku. Jika perlu sampel beku disimpan dahulu dalam suhu 2-8°C selama <18 jam (FDA BAM) atau 2-5 sekitar 18 jam (USDA/FSIS) lalu ditimbang untuk menghilangkan air beku yang ikut tertimbang.
9. Jumlah sampel minimal untuk bahan daging, kacang-kacangan padat adalah $50 \pm 0,1$ g, sedangkan sampel produk telur, sayuran dan buah adalah $100 \pm 0,1$ g (AOAC).
10. Jika menginginkan perbandingan (1:9) yang benar-benar presisi maka sampel padat ditimbang terlebih dahulu dalam botol (misalnya didapatkan 1,12 g) kemudian ditambah pelarut 9 kali dari sampel yang ditimbang ($1,12 \times 9$).

Serial dilution

1. Gunakan botol atau tabung pelarut dari *borosilicate resistant glass* dengan tutup plastik berulir yang tidak menghasilkan senyawa bakteriostatik. Jangan menggunakan kapas sebagai tutup botol karena akan mengganggu proses homogenisasi. Botol plastik nontoksik yang dapat disterilisasi dapat menggantikan botol kaca jika botol kaca tidak tersedia (APHA). Volume botol atau tabung yang dipakai harus melebihi volume pelarut untuk keperluan pengocokan, misalnya gunakan botol 150 ml untuk pelarut 90 ml.
2. Lakukan pengenceran 1 : 9 dengan memasukkan 10 ml ke dalam tabung pengenceran selanjutnya berisi 90 ml pelarut untuk seluruh tingkat pengenceran (AOAC dan FDA BAM). Namun pada umumnya perbandingan 1 ml : 9 ml pelarut telah cukup (banyak

referensi yang memakai perbandingan ini). Hal yang perlu dipertimbangkan adalah distribusi sel yang terdapat pada sampel dan sifat sampel itu sendiri. Jika sifat partikel sampel tidak mudah larut, ukuran partikelnya besar dan sel kemungkinan menempel pada partikel sampel (seperti pelet, tepung dll.) maka sebaiknya membutuhkan perbandingan pengenceran yang besar. Namun jika sampel bersifat cair memiliki konsentrasi mikroorganisme yang benar-benar homogen, sel saling terpisah dan tersebar sempurna (seperti hasil fermentasi, susu, probiotik dalam kemasan dll.) maka penggunaan perbandingan pengenceran yang lebih kecil dapat menghemat penggunaan alat dan bahan. Alternatif lainnya yaitu pada pengenceran awal (10-1 atau 10-2) memakai perbandingan yang lebih tinggi (10:90) atau (5:45) kemudian pengenceran selanjutnya memakai perbandingan yang lebih rendah (1:9).

3. Jangan menyederhanakan dua atau lebih tingkat pengenceran, misalnya 1 ml dimasukkan ke dalam 99 ml, 0,1 dimasukkan ke dalam 9,9 ml atau 0,1 ml dimasukkan ke dalam 99,9 ml walaupun beberapa referensi menyarankan demikian. Hal ini tentu dapat mempersingkat pekerjaan tetapi efeknya negatifnya sangat besar terhadap kesempatan sel mikroorganisme yang terambil oleh pipet karena menghilangkan tahap pengambilan/transfer secara gradual. Pengambilan secara bertahap dapat menurunkan ketidakpastian seragamnya penyebaran sel saat dilakukan pempipetan terutama pada tingkat pengenceran yang sesuai. Sebagai ilustrasinya, tentu sangat berbeda kemungkinan sel yang masuk ke dalam pipet jika diambil 1 ml dengan 0,1 ml lalu keduanya dilarutkan menjadi 10 ml padahal didalamnya terkandung sekitar 10 CFU/ml.
4. Gunakan diluents atau pelarut Butterfield Buffered Phosphate yaitu; (larutan stok) : larutkan 34 g KH_2PO_4 dalam 500 ml H_2O . atur pH 7,2 dengan menambahkan +/- 175 ml NaOH 1M lalu tambahkan H_2O sampai 1000 ml dan simpan dalam refrigerator. (Pelarut) : larutkan 1,25 ml larutan stok ke dalam 1 L H_2O kemudian sterilisasi menggunakan autoklaf (AOAC). Pepton water (0,1% peptone) adalah pelarut yang memiliki maximum *recovery dilution* (MRD) yaitu pelarut yang paling aman dan tidak letal untuk mikroorganisme. Jika tidak ada maka dapat memakai garam fisiologis yaitu 0,85% NaCl. Sebaiknya jangan menggunakan

pelarut akuades karena dikhawatirkan sel dapat pecah yang disebabkan tekanan osmotik yang tinggi (kadar air sel lebih rendah).

5. Disarankan untuk tidak memakai pelarut yang langsung diambil dari refrigerator karena *cold shock* dapat mencegah mikroorganisme bereproduksi (Collins *et al*, 2004).
6. Untuk menghasilkan keseragaman yang sempurna, sebaiknya tabung dikocok berayun 25 kali dengan ketinggian tangan pengocokan 30 cm / 1 kaki selama 7 detik. Jika tabung tersebut didiamkan lebih dari 3 menit sebelum diambil untuk ditransfer maka kocok lagi 25 kali dengan ketinggian tangan pengocokan 30 cm / 1 kaki selama 7 detik (FDA BAM). Penghomogenisasian tentunya memperhatikan jenis sampel yang dianalisa. Jika sampel dapat dengan cepat mengendap maka sebaiknya kurang dari 3 menit harus dikocok sebelum ditransfer. Pada umumnya mikroorganisme dari sampel padat yang dilarutkan akan terlepas ke dalam pelarut sehingga tampak diatas sampel padat yang mengendap, tetapi tidak semua jenis seperti itu, misalnya bakteri yang membentuk biofilm atau mampu menempel pada substrat.
7. Usahakan cegah terbentuknya busa saat pengocokan karena dikhawatirkan terdapat sel yang terperangkap pada gelembung udara dan tidak terambil oleh pipet, jika hal tersebut sulit dilakukan maka pelarut dapat disedot-keluarkan sebanyak 10 kali dengan tip yang terendam pelarut, tetapi hal ini lebih cocok untuk sampel cair seperti susu (Collins *et al*, 2004).
8. Jangan mentransfer volume sampel <10% dari volume total pipet, misalnya untuk mentransfer cairan 0,1 ml jangan menggunakan pipet ukur >1 ml (5 ml atau 10 ml) (AOAC).
9. Jika ingin memindahkan cairan sebanyak 1 ml memakai pipet ukur maka sebaiknya ambil cairan sebanyak 10 ml lalu ditransfer atau 1 ml, bukan mengambil 1 ml dan memindahkannya 1 ml juga. Hal ini dapat menghindari sisa air yang tertinggal pada pipet ukur.
10. Sebaiknya pengambilan cairan pada tabung dilakukan pada kedalaman 1-1,5 cm dari permukaan (Collins *et al*, 2004). Jadi pastikan bahwa pipet atau tip dapat masuk ke dalam tabung dengan sempurna.

11. **Jangan menyedot cairan pipet dengan mulut**, gunakan pipet aid atau pipetors.
12. Saat mentransfer (mengeluarkan) cairan menggunakan pipet ukur kaca, sisa sedikit cairan yang terdapat di ujung pipet jangan dikeluarkan atau ditiup karena pipet telah sengaja dikalibrasi sebanyak volume yang diambil dan dengan menyisakan sejumlah cairan diujung.
13. Lebih baik menggunakan pipet otomatis dengan tips dibandingkan dengan pipet ukur kaca karena volumenya telah diatur oleh penekanan pompa, lain halnya penggunaan pipet ukur kaca yang harus menuntut ketelitian penglihatan skala saat dilakukan pempipetan.
14. Umumnya pada pengenceran 1/10 dari sampel padat umumnya terdapat partikel-partikel besar yang sering mengganggu dan memacetkan pempipetan. Untuk mengatasinya ujung tips yang terbuat dari plastik dapat dipotong sedikit. Lalu apakah berpengaruh terhadap keakurasian volume cairan yang diambil (misalnya tips 1 ml dikhawatirkan volume yang terambil menjadi 0,9 ml)? untuk mengetahuinya buktikan dengan penaraan pada pipet dengan tips terpotong dan dibandingkan dengan tips yang tidak terpotong dengan sama-sama menimbang sebanyak 1 ml akuades pada suhu 25°C yang sebanding dengan 1 g pada timbangan analitik. Lakukan dengan beberapa kali ulangan sesuai petunjuk manual pipet otomatis.
15. Jika perkiraan konsentrasi mikroorganisme pada sampel sulit digambarkan dan pengenceran yang sesuai sulit ditentukan maka dilakukan juga penanaman dari pengenceran 1/10 selain dari pengenceran yang diinginkan. Hal ini dilakukan sebagai pembanding jika dari pengenceran yang diinginkan tidak terdapat pertumbuhan.
16. Sebaiknya pipet ukur dimasukkan ke dalam wadah *stainless steel* atau aluminium kotak atau silinder dengan panjang 40 cm. Jangan menggunakan pipet kontainer yang terbuat dari tembaga. Jika tidak terdapat wadah pipet maka pipet ukur dapat dibungkus satu per satu menggunakan kertas kraft (APHA).
17. Jika perlu lakukan kontrol pengenceran bertingkat dengan suatu kontrol enumerasi yang telah diketahui jumlah selnya (estimasi).

Kontrol ini dapat berupa kultur yang telah diawetkan dan dimampatkan ke dalam sesuatu (tepung misalnya) yang telah diketahui kisaran konsentrasinya (banyak tersedia secara komersial).

Teknik penanaman (*spread plate* dan *pour plate*)

1. Lakukan penanaman pada dua cawan (*duplicate/duplo*) (AOAC).
2. Gunakan cawan berukuran 15 mm x 100 mm atau 15 mm x 90 mm. pilih cawan yang bebas gelembung dan goresan sehingga distribusi agar dapat merata (AOAC dan APHA).
3. Untuk mengecek LAF bekerja dengan baik maka buatlah kontrol sterilitas yaitu mengujinya dengan air sampler sebanyak 1 m³ jika ada atau dengan pilihan lainnya yaitu metode *exposure plate* selama 15 menit.
4. Jika diperlukan inkubasi sampai beberapa hari maka sebaiknya cawan direkatkan menggunakan selotip atau sejenisnya, cara lainnya yaitu cawan dimasukkan ke dalam plastik (Collins et al, 2004).

Spread plate

1. Jangan memasukkan sampel 50 ul (setengah dari yang dipersyaratkan (0,1 ml)) karena dimungkinkan akan mempengaruhi jumlah bakteri yang terambil secara acak oleh pipet.
2. Pengambilan cairan sebaiknya dilakukan dengan mikropipet 100 ul untuk mengurangi kesalahan. Jika dilakukan menggunakan pipet ukur 1 ml berskala 0,1 ml maka ambil sebanyak 1 ml kemudian kurangi sebanyak 0,1 ml.
3. Ratakan sampel dengan batang L (L rod atau *hockey-stick-shape-glass-rod*) atau *glass spreader* atau *Drigalsky spatulas* ke seluruh permukaan agar biarkan sampai kering (+/- 10 menit) jika perlu inkubasi dalam posisi tidak terbalik selama 1 jam untuk mengeringkan cawan (AOAC). Cara lainnya untuk mengeringkan cawan yaitu proses perataannya dilakukan dibawah aliran udara LAF beberapa menit. Aliran udara dapat membantu mempercepat evaporasi. Jangan sampai meninggalkan sedikitpun lapisan tipis air di

permukaan agar karena lapisan air ini dapat membuat pertumbuhan koloni menjadi spreader/SPD.

4. Sterilisasi ulang batang L sebaiknya menggunakan api. Batang L yang basah harus dibakar sedikit lama karena terdapat lapisan air yang dapat mengganggu efisiensi sterilisasi. Batang L setelah dibakar jangan langsung digunakan untuk menyebarkan karena masih terlalu panas. Untuk menghindari kontaminasi, sebaiknya saat dilakukan penyebaran pada beberapa cawan bersamaan, dilakukan dari pengenceran tertinggi ke pengenceran rendah untuk mengurangi kemungkinan tercampurnya sel dari load mikroorganisme yang penuh (pengenceran rendah).
5. Buatlah kontrol metode *spread plate* dengan melakukan *spread plate* air steril pada media yang sama digunakan untuk uji. Lakukan pada saat yang sama dengan pengujian.

Pour plate

1. Tambahkan media pertumbuhan sebanyak 12-15 ml (FDA BAM) atau 15 -20 ml (HPA) untuk cawan dengan diameter 9 cm.
2. Kocok dengan cara memutar melingkar, ke depan-belakang tiap cawan petri minimal selama 10 detik. Jeda waktu antara penambahan sampel dan media tidak lebih dari 10 menit (HPA) atau 15 menit (FDA BAM). Cara penghomogenisasian lain: goyangkan cawan kearah kiri-kanan 5 kali, memutar searah jarum jam 5 kali, goyangkan kea rah depan-belakang 5 kali, memutar berlawanan jarum jam 5 kali (Spencer, 2001). Cawan dapat juga digoyang berputar membentuk angka 8 sehingga gaya sentrifugasi pada media saling meniadakan.
3. Jaga cawan petri tetap dalam posisi datar dalam meja dan cawan jangan ditumpuk sebelum agar memadat.
4. Tambahkan media sesegera mungkin jika sampel mengandung bahan higroskopik seperti pati atau tepung (FDA BAM).
5. Suhu media pertumbuhan saat dituangkan yaitu $45\pm 1^{\circ}\text{C}$. (FDA BAM), $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$ (Collins *et al*, 2004), $45\text{-}60^{\circ}\text{C}$ (Spencer, 2001). Untuk menjaga media tetap hangat maka dijaga suhunya pada *Water bath* bersirkulasi yang dapat menjaga suhu $45\pm 1^{\circ}\text{C}$.
6. Buat kontrol negatif (*sterility check*) dengan memasukkan 1 ml air steril (sebaiknya disterilisasi pada kelompok yang sama dengan

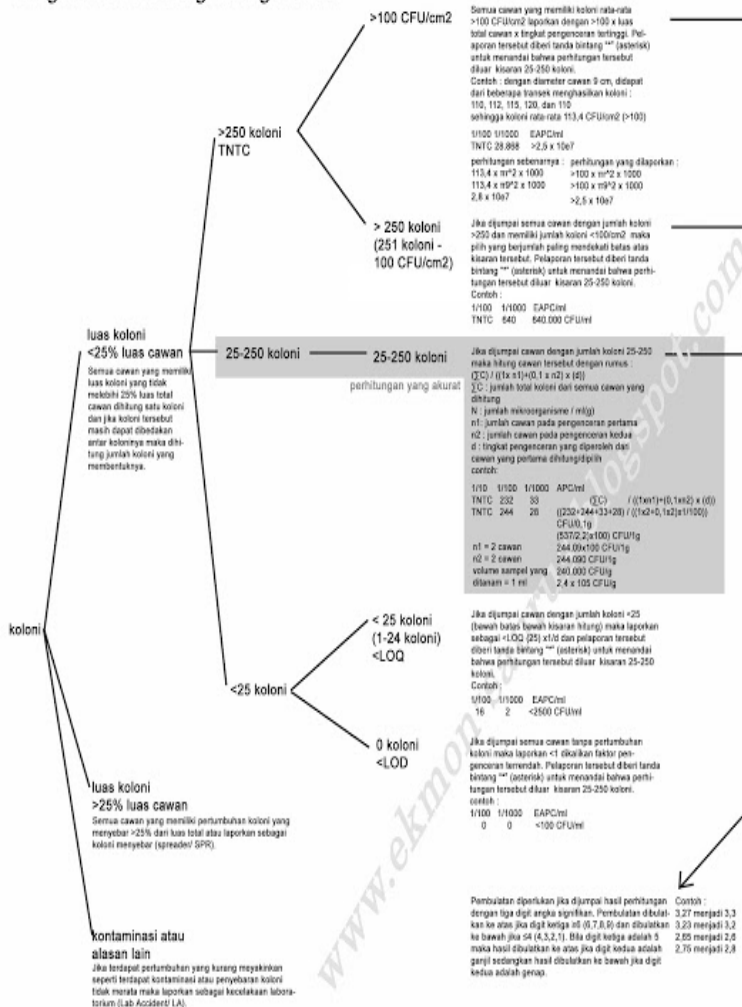
peralatan dan media yang digunakan) ditambah 15-20 ml media ke dua cawan petri steril lalu diinkubasi dengan waktu dan suhu yang sama.

7. Buatlah kontrol metode pour plate dengan melakukan pour plate air steril pada cawan yang sama digunakan untuk uji. Lakukan pada saat yang sama dengan pengujian.

Inkubasi dan Menghitung koloni

1. Inkubator memiliki suhu yang konstan dan variasi yang ada tidak boleh melebihi $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$
2. Sisakan jarak 2,5 cm antara tumpukan cawan dengan tembok inkubator supaya distribusi suhu merata (APHA).
3. Hitung koloni dengan kisaran 30-300 koloni/cawan (AOAC) atau 25-250 koloni/cawan (FDA BAM). Koloni yang tumbuh umumnya berdiameter 2-5 mm.
4. Gunakan *Quebec Colony Counter* berlatar belakang hitam dengan sumber cahaya dan transek berskala (APHA).
5. Jangan dihitung sebelum waktu inkubasi selesai supaya terdapat keseragaman dalam perhitungan dan mengurangi ambiguitas.
6. Hitung segera setelah keluar dari inkubator, jika hal itu tidak dimungkinkan simpan cawan pada suhu 4°C dan dihitung tidak lebih dari 24 jam (HPA).
7. Sebaiknya meja tempat menghitung berlatar belakang hitam.

Diagram alir menghitung koloni



Keterangan :
TNTC : Too Numerous to Count
APC : Aerobic Plate Count
EAPC : Estimated Aerobic Plate Count
LOD : Limit of Detection
LOQ : Limit of Quantification

E. Indra Prashika, 2012
Referensi :
Mattern, Larry and J. T. Peeler, 2001, *Aerobic Plate Count*, BAM (Bacteriological Analytical Manual), Chapter 3, Food and Drug Administration.

Gambar 20. Diagram Alir Menghitung Koloni

BAB VII TEKNIK FERMENTASI TABUNG BERSERI (MPN:MOST PROBABLE NUMBER)

Metode MPN muncul pada awal abad 20. Estimasi paling akurat dari tabel MPN di publikasikan oleh Mc Crady pada tahun 1915 kemudian dasar statistik dari metode MPN dikemukakan oleh Halvorson dan Ziegler (1933), Eisenhart dan Wilson (1943) dan Cochran (1950). Pada tahun 1957 Woodward menyarankan tentang pengabaian hasil positif (banyak tabung positif pada pengenceran tinggi dan sebaliknya) yang dapat meningkatkan kesalahan laboratorium dalam tabel MPN. Kemudian De Mann pada tahun 1983 mempublikasikan tentang metode perhitungan tingkat kepercayaan (*confidence interval*) dalam tabel MPN.

Prinsip yang digunakan dalam metode MPN

MPN adalah suatu metode enumerasi mikroorganisme yang menggunakan data dari hasil pertumbuhan mikroorganisme pada medium cair spesifik dalam seri tabung yang ditanam dari sampel padat atau cair yang ditanam berdasarkan jumlah sampel atau diencerkan menurut tingkat seri tabungnya sehingga dihasilkan kisaran jumlah mikroorganisme yang diuji dalam nilai MPN/satuan volume atau massa sampel.

Contoh :

Data yang didapat adalah: 3 tabung positif dari pengenceran 1/10, 2 tabung positif dari pengenceran 1/100 dan 1 tabung positif dari pengenceran 1/1000. Lalu dicocokkan dengan tabel, menghasilkan nilai : 150 MPN/g

Prinsip utama metode ini adalah mengencerkan sampel sampai tingkat tertentu sehingga didapatkan konsentrasi mikroorganisme yang

pas/sesuai dan jika ditanam dalam tabung menghasilkan frekuensi pertumbuhan tabung positif “kadang-kadang tetapi tidak selalu”. Semakin besar jumlah sampel yang dimasukkan (semakin rendah pengenceran yang dilakukan) maka semakin “sering” tabung positif yang muncul. Semakin kecil jumlah sampel yang dimasukkan (semakin tinggi pengenceran yang dilakukan) maka semakin “jarang” tabung positif yang muncul. Jumlah sampel/pengenceran yang baik adalah yang menghasilkan tabung positif “kadang-kadang tetapi tidak selalu”. Semua tabung positif yang dihasilkan sangat tergantung dengan probabilitas sel yang terambil oleh pipet saat memasukkannya ke dalam media. Oleh karena itu homogenisasi sangat mempengaruhi metode ini. Frekuensi positif (ya) atau negatif (tidak) ini menggambarkan konsentrasi mikroorganisme pada sampel sebelum diencerkan.

Asumsi yang diterapkan dalam metode MPN adalah :

- Bakteri terdistribusi sempurna dalam sampel
- Sel bakteri terpisah-pisah secara individual, tidak dalam bentuk rantai atau kumpulan (bakteri *coliform* termasuk *E. coli* terpisah sempurna tiap selnya dan tidak membentuk rantai).
- Media yang dipilih telah sesuai untuk pertumbuhan bakteri target dalam suhu dan waktu inkubasi tertentu sehingga minimal satu sel hidup mampu menghasilkan tabung positif selama masa inkubasi tersebut.
- Jumlah yang didapatkan menggambarkan bakteri yang hidup (*viable*) saja. Sel yang terluka dan tidak mampu menghasilkan tabung positif tidak akan terdeteksi.

MPN dinilai dari perkiraan unit tumbuh (*GrowthUnit/ GU*) seperti CFU, bukan dari sel individu. Meskipun begitu baik nilai CFU atau MPN dapat menggambarkan seberapa banyak sel individu yang tersebar dalam sampel. Metode MPN dirancang dan lebih cocok untuk diterapkan pada sampel yang memiliki konsentrasi $<100/g$ atau ml. Oleh karena itu nilai MPN dari sampel yang memiliki populasi mikroorganisme yang tinggi umumnya tidak begitu menggambarkan jumlah mikroorganisme yang sebenarnya. Jika jumlah kombinasi tabung positif tidak sesuai dengan tabel maka sampel harus diuji ulang.

Semakin banyak seri tabung maka semakin tinggi akurasi tetapi juga akan mempertinggi biaya analisa.

Pemilihan media sangat berpengaruh terhadap metode MPN yang dilakukan. Umumnya media yang digunakan mengandung bahan nutrisi khusus untuk pertumbuhan bakteri tertentu. Misalnya dalam mendeteksi kelompok *coliform* dapat menggunakan media Brilliant Green Lactose 2% Bile (BGLB) broth. Di dalam media ini mengandung *lactose* dan garam empedu (*bile salt*) yang hanya mengizinkan *coliform* untuk tumbuh. Jika terdapat ketidaksesuaian jenis media dan bakteri yang diinginkan maka metode MPN akan menghitung bukan bakteri yang dituju. Untuk menghitung *coliform* dapat menggunakan Lauryl Sulphate Tryptose (LST) broth, sedangkan untuk menghitung *E. coli* diperlukan media EC (*Escherichia coli*) broth. Jadi nilai MPN adalah suatu angka yang menggambarkan hasil yang PALING MUNGKIN.

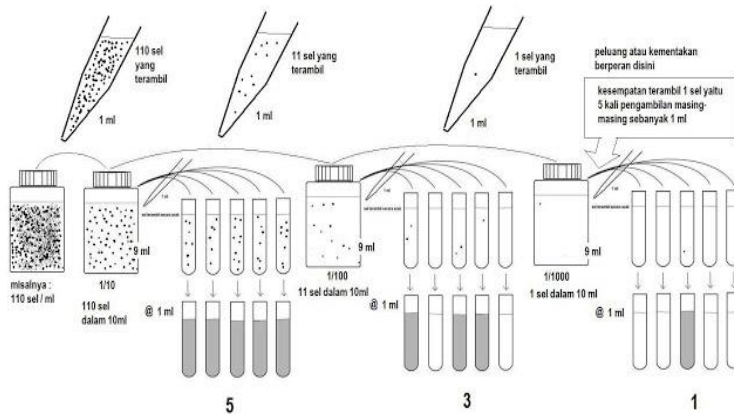
Aspek peluang dalam metode MPN

Berdasarkan prinsip diatas maka “seharusnya/sebaiknya” jumlah tabung positif pada pengenceran $1/10 > 1/100 > 1/1000$ (misalnya 5-3-1) karena setiap pengenceran mengurangi jumlah mikroorganisme target dan akibatnya semakin kecil kesempatannya untuk membuat tabung menjadi positif. Namun seringkali hasil yang didapat tidak sesuai dengan logika peluang, seperti 5-3-4 yang menghasilkan nilai 210. Bisa saja banyak sel tidak sengaja terambil dan memperbanyak pengenceran selanjutnya atau homogenisasi tidak berlangsung sempurna.

Untuk memahami peranan peluang dalam mendistribusikan sel sehingga menghasilkan tabung positif maka jumlah tabung positif (digaris bawah) pada tabel dicoba untuk dirunut dan diilustrasikan kembali dalam proses penanamannya pada gambar berikut (dianggap bahwa nilai MPN/ml sama dengan sel/ml). Namun perlu diingat, jumlah sel yang terambil tidak selalu seperti itu, semuanya adalah peluang dan angka yang didapat adalah angka paling mungkin.

MPN memiliki tingkat keberagaman data yang lebih besar dibandingkan dengan hitungan cawan sehingga satuan metode yang menghasilkan satuan CFU memiliki sensitivitas yang lebih tinggi.

$$5 \ 3 \ 1 = 110 \text{ MPN/ml}$$



Gambar 21. Bagan alir pengerjaan metode MPN

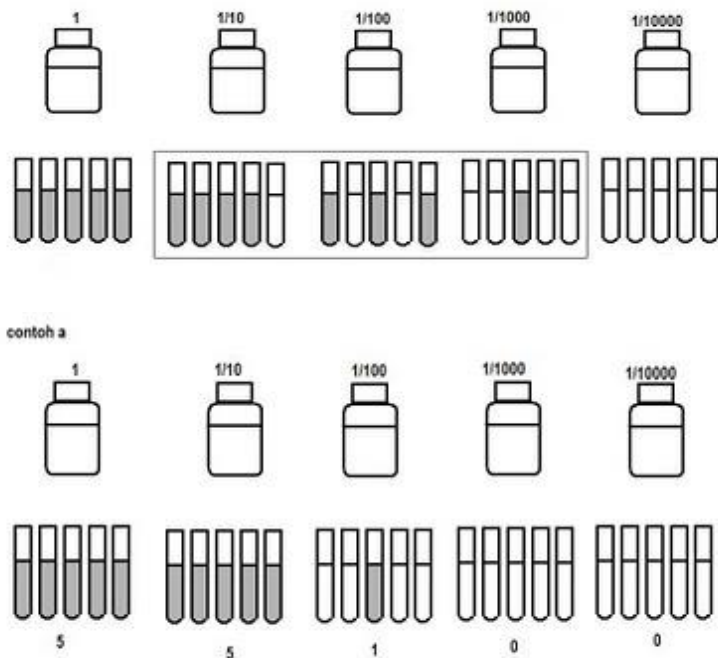
Kaidah pemilihan tabung positif dan cara pelaporannya

Syarat umum yang dipakai dalam pemilihan tabung positif adalah

- Pilih pengenceran terendah yang tidak semua tabung menghasilkan tabung positif
- Pilih pengenceran tertinggi yang paling tidak memiliki satu tabung positif
- Pilih semua pengenceran diantaranya.
- Kalikan setiap seri tabung yang dipilih dengan pengenceran yang diambil.

Misalnya : dari inokulum 1, 0,1, 0,01, 0,001 dan 0,0001 menghasilkan kombinasi tabung positif 5-4-3-1-0 maka dipilih 5-4-3-1-0 bukan 5-4-3-1-0 atau 5-4-3-1-0 sehingga didapat nilai MPN 33/ml.

Namun tidak semua keadaan menggambarkan kondisi ideal seperti diatas. Untuk kasus semua seri tabung menghasilkan tabung positif dan tidak semua pengenceran menghasilkan tabung positif dapat dilihat pada contoh berikut:



Gambar. 22. Kemungkinan kombinasi MPN

Contoh	Tingkat pengenceran					Kombinasi tabung positif	MPN/ ml
	10^0	10^1	10^2	10^3	10^4		
a	5	5	1	0	0	5-1-0	33
b	4	5	1	0	0	5-1-0	33
c	5	4	4	1	0	4-4-1	40
d	5	4	4	0	1	4-4-1	40
e	5	5	5	5	2	5-5-2	5400
f	0	0	1	0	0	0-0-1	0,18
g	4	4	1	1	0	4-4-2	4,7

Contoh a) 5-5-1-0-0 dan b) 4-5-1-0-0 ; pilih pengenceran tertinggi yang menghasilkan seluruh tabung positif dan dua pengenceran berikutnya.

Contoh c) 5-4-4-1-0 ; jika pada tingkat pengenceran yang lebih tinggi masih menghasilkan tabung positif (103 menghasilkan 1 tabung positif) maka pada tingkat pengenceran tersebut tingkat pengenceran tertinggi yang dipilih.

Contoh d) 5-4-4-0-1 ; Jika pada tingkat pengenceran tertentu semua menghasilkan tabung negatif tetapi pengenceran selanjutnya masih terdapat tabung positif, maka yang dinyatakan tabung positif adalah tingkat pengenceran sebelumnya.

Contoh e) 5-5-5-5-2 ; Jika pada tingkat pengenceran tertinggi masih terdapat tabung positif, maka pilih tingkat pengenceran sebelumnya.

Contoh f) 0-0-1-0-0 ; jika tingkat pengenceran tertentu menghasilkan tabung positif maka pilih dua tingkat pengenceran sebelumnya

Contoh g) 4-4-1-1-0 dipilih menjadi 4-4-2 ; jika pada pengenceran yang lebih tinggi masih menghasilkan tabung positif maka tambahkan tabung positif tersebut ke tingkat pengenceran sebelumnya.

Catatan : pada contoh e hasil untuk 5-5-2 dengan inokulum 1,0, 0,01 dan 0,001 ml adalah 540 tetapi karena diambil pengenceran dari (inokulum) 0,01, 0,001 dan 0,0001 maka nilai harus dikalikan 10. Begitu pula sebaliknya untuk contoh g yang diambil dari pengenceran (inokulum) 1, 0,1 dan 0,01 maka nilai 47 harus dibagi 10.

Menghitung angka MPN tanpa tabel

Nilai MPN ternyata dapat dicari dengan rumus berikut (Thomas formula):

$$\text{MPN/g} = \frac{(\sum g_i)}{(\sum t_i m_i \sum (t_i - g_i) m_i)^{(1/2)}}$$

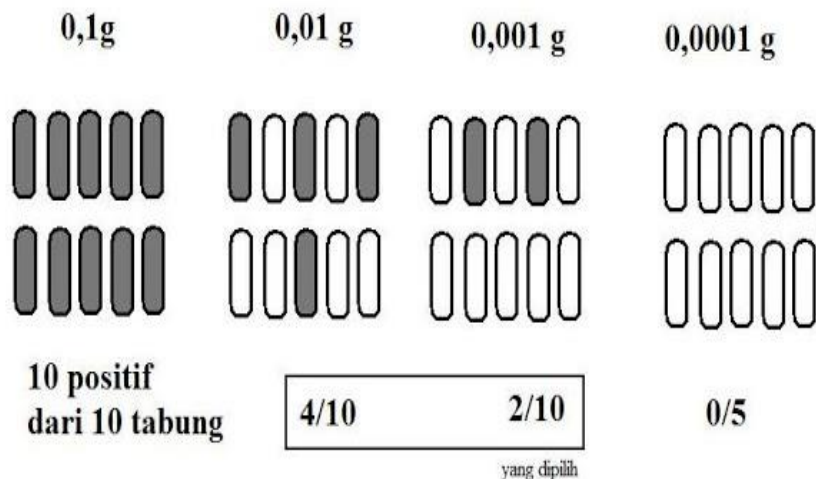
$\sum g_i$ = jumlah tabung positif pada pengenceran yang dipilih

$\sum t_i m_i$ = jumlah (g/ml) dari sampel dalam semua tabung pada pengenceran yang dipilih

$\sum (t_i - g_i) m_i$ = jumlah (g/ml) dari sampel pada dalam tabung negatif pada pengenceran yang dipilih

Contoh 1 :

Untuk hasil (10/10, 10/10, 4/10, 2/10, 0/10) jika digunakan tabel maka dipilih (10/10, 10/10, 4/10, 2/10, 0/10) yaitu kombinasi 10-4-2 = 70/g tetapi dalam perhitungan hanya gunakan (10/10, 10/10, 4/10, 2/10, 0/10).



$$\text{MPN/g} = \frac{(\sum g_i)}{(\sum t_i m_i \sum (t_j - g_j) m_j)^{(1/2)}}$$

$$\sum g_i \Rightarrow 6 \quad \begin{array}{l} \swarrow 4+2 \\ \text{ada 10 seri tabung} \end{array}$$

$$\sum t_i m_i \Rightarrow (10 \times 0,01) + (10 \times 0,001) = 0,11 \quad \begin{array}{l} \nearrow \text{sampel yang dimasukkan (g)} \end{array}$$

$$\sum (t_j - g_j) m_j \Rightarrow (6 \times 0,01) + (8 \times 0,001) = 0,068$$

\nearrow jumlah tabung negatif dari 0,01g = 6 \nearrow jumlah tabung negatif dari 0,001g = 8

$$\begin{aligned} \text{MPN/g} &= 6 / (0,068 \times 0,11)^{(1/2)} \\ &= 6 / 0,086 \\ &= 70 / \text{g} \end{aligned}$$

Contoh 2 :

Untuk hasil (5/5, 3/5, 1/5, 0/5) pemilihan dipilih (5/5, 3/5, 1/5, 0/5) yaitu kombinasi 5-3-1 = 110/ml tetapi dalam perhitungan hanya gunakan (5/5, 3/5, 1/5, 0/5)

Dengan cara yang sama maka MPN/g

$$= 4/(0,024 \times 0,055)^{1/2}$$

$$= 4/0,0363$$

$$= 110/\text{ml} , \text{ (sama dengan hasil yang didapatkan dari tabel)}$$

Hubungan antara MPN dan CFU

Perlu disadari bahwa ulasan lengkap dan mendalam mengenai hubungan antara satuan hitung CFU dan MPN cukup jarang diperoleh di mesin pencari dan permintaan akan informasi ini begitu tinggi di kalangan pelajar. Banyak text book mikrobiologi yang menjelaskan panjang lebar mengenai teknik plate count (CFU) dan teknik fermentasi tabung berseri (MPN) tetapi jarang yang menjelaskan korelasi diantaranya. Oleh karena itu dengan sedikit referensi yang terkumpul kami memberanikan diri untuk mengupasnya. Artikel ini dibuat untuk membantu pelajar Indonesia dalam memahami hubungan satuan hitung yang umum dipakai di ilmu mikrobiologi tersebut. Diharapkan dengan artikel ini dapat menjawab pertanyaan umum seperti satuan mana yang lebih akurat dan presisi? kelebihan dan kekurangan masing-masing? atau apakah bisa mengkonversi dari MPN ke CFU?

Latar belakang satuan MPN dan CFU

Banyak pendekatan yang dilakukan oleh para peneliti dalam menentukan jumlah sel suatu mikroorganisme dalam satuan volume atau berat. Hal yang ingin diketahui secara akurat adalah seberapa

banyak jumlah sel mikroorganisme tersebut. Sesuai dengan metode yang digunakan banyak satuan yang menggambarkan jumlah mikroorganisme (atau pendekatan lain) dalam sampel seperti : CFU (hitungan koloni pada cawan), MPN (fermentasi tabung berseri), sel (hitungan langsung mikroskopik), OD (turbidimetri dengan spektrofotometer), cm (diameter koloni jamur), RLU (fluoresensi ATP). dll. Namun yang sering dipakai secara internasional dan ada dalam peraturan ambang batas cemaran mikroorganisme di setiap negara adalah CFU dan MPN. Di dalam SNI (Standar Nasional Indonesia) sendiri hanya digunakan dua satuan ini pada batas cemaran mikroorganisme untuk setiap jenis sampel pada analisa mikrobiologi kuantitatif.

MPN adalah suatu metode uji pengenceran bertingkat (serial dilution) untuk mengukur konsentrasi mikroorganisme target dengan perkiraan. MPN sangat berguna untuk mendeteksi sampel dengan konsentrasi organisme kurang dari 100/g, terutama untuk sampel susu dan air, sedangkan untuk sampel makanan akan lebih akurat jika diuji dengan metode hitungan cawan. Hanya mikroorganisme hidup yang mampu dideteksi oleh MPN. Asumsi utama dalam metode MPN adalah bakteri harus terdistribusi sempurna dalam larutan sampel, terpisah baik, tidak terkumpul satu sama lain. Setiap tabung akan terdeteksi pertumbuhannya meskipun hanya mengandung satu sel yang hidup. Setiap individu tabung memiliki data yang berdiri sendiri (independent). Prinsip utama dalam MPN adalah mengencerkan sampel sampai suatu tingkat pengenceran sehingga inokulum yang ditanam dalam tabung menghasilkan data tabung positif dan negatif dengan frekuensi “kadang-kadang tapi tidak selalu” sehingga terdapat variasi tabung positif dan negatif dalam seri tabung tertentu. Banyaknya seri tabung dan jumlah tabung yang positif akan mampu memperkirakan jumlah mikroorganisme target pada sampel asalnya. Jika dalam MPN menggunakan target mikroorganisme yang dalam preparasi sampel dan pengencerannya tetap menunjukkan sel yang tidak terpisah dan berkelompok, maka nilai MPN sebaiknya dapat dinyatakan dalam perkiraan GUs (Growth Units) atau CFUs (Colony Forming Units). Namun sebagian besar metode MPN digunakan untuk menghitung mikroorganisme target yang benar-benar terpisah

individu seperti *coliform* dan *E. coli*. Hasil dari metode MPN memiliki derajat kepercayaan karena proses perhitungannya merupakan hasil dari peluang. Arti dari 95% confidence intervals dalam tabel MPN adalah kemungkinan paling tidak 95% rentang derajat kepercayaan dari hasil akhir adalah sesuai dengan konsentrasi yang sebenarnya. Confidence limit dalam MPN dinyatakan dalam dua digit signifikan, misalnya nilai 400 adalah hasil pembulatan antara 395 dan 405 (BAM, 2010).

Lain halnya dengan metode hitungan cawan yang menghasilkan satuan CFU. CFU pasti dihasilkan dari hitungan koloni pada media padat. Sutton (2006) menyatakan bahwa CFU menggambarkan asumsi setiap sel mikroorganisme hidup dalam suspensi akan tumbuh menjadi satu koloni setelah ditumbuhkan dalam media pertumbuhan dan lingkungan yang sesuai. Setelah diinkubasi, jumlah koloni yang tumbuh dihitung dan merupakan perkiraan atau dugaan dari jumlah mikroorganisme dalam suspensi tersebut. Koloni yang tumbuh tidak selalu berasal dari satu sel mikroorganisme karena beberapa mikroorganisme tertentu cenderung membentuk kelompok atau berantai seperti *streptococcus*, *diplococcus* dll. Berdasarkan hal tersebut maka lebih tepat digunakan istilah unit pembentuk koloni bukan sel.

Penentuan jumlah koloni yang dihitung setiap cawan dipengaruhi oleh tingkat/derajat kesalahan dalam perhitungan tersebut. Perhitungan melebihi batas atas maka hasilnya akan menjadi bias karena terlalu dekatnya antar koloni, sedangkan perhitungan dibawah batas hitung (LOQ) memberikan hasil yang jauh dari distribusi normal dan eror yang tinggi. Batasan ini tergantung jenis mikroorganisme target dan metode yang digunakan. Kisaran hitung yang disarankan untuk TPC/APC adalah 30-300 atau 25-250 koloni/cawan.

Perbandingan MPN dan CFU

CFU dan MPN adalah satuan yang asal muasalnya terpisah walaupun menggambarkan tujuan yang sama yaitu memperkirakan jumlah sel sebenarnya. Kedua satuan ini tidak berhubungan langsung, yang artinya tidak selalu x CFU/ml adalah x MPN/ml walaupun data antara CFU/ml dan MPN/ml menunjukkan korelasi positif. Berikut adalah beberapa hasil perbandingan antara metode hitungan cawan (spread/pour plate pada media agar selektif atau membran filtrasi) dan metode fermentasi tabung berseri/MPN yang diambil dari beberapa publikasi sebelumnya.

Metode MPN menghasilkan data positif *Listeria spp.* dan *L. monocytogenes* lebih banyak dibandingkan dengan metode hitungan cawan sehingga dapat disimpulkan bahwa MPN lebih sensitif dibanding CFU dalam uji *Listeria*. Namun metode hitungan cawan lebih dipilih digunakan secara rutin karena memiliki produktivitas yang sedikit lebih baik dan variasi hasil lebih kecil, meskipun begitu metode MPN dapat dipilih untuk studi epidemiologi karena memiliki detection limit (LOD) yang jauh lebih rendah dibanding hitungan cawan yaitu sekitar 66% dari batas deteksi hitungan cawan.

Metode MPN (terotomatisasi) menghasilkan data rata-rata lebih rendah dibandingkan hitungan cawan dengan metode yang bersumber dari ISO dan hitungan cawan dengan petrifilm untuk menghitung kelompok *Enterobacteriaceae*. Jadi dapat disimpulkan bahwa metode hitungan cawan lebih banyak mendeteksi *Enterobacteriaceae* (lebih sensitif) daripada MPN.

Hasil perhitungan *E. coli* dalam menentukan kualitas air menggunakan metode MPN menghasilkan konsentrasi lebih besar dibanding hitungan cawan. Namun berbeda dengan perhitungan *Enterococci* yang menghasilkan metode MPN lebih rendah daripada hitungan cawan. Metode hitungan cawan dengan penanaman pada dry rehydratable film media (*Compact Dry*) tidak memiliki variasi/perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan metode MPN yang bersumber dari AOAC untuk menguji bakteri *coliform* pada daging mentah.

Metode penanaman pada dry rehydratable film mempunyai tingkat reproduktibilitas dan repeatabilitas yang sama atau lebih baik jika dibandingkan dengan metode MPN yang bersumber dari AOAC untuk menghitung *coliform* dan *E. coli*. penelitian ini dilakukan pada berbagai sampel pangan yang diuji oleh 14 laboratorium dalam rangka studi kolaboratif untuk mengadopsi metode ini menjadi metode resmi AOAC.

Prosedur MPN mempunyai tingkat keberagaman (variable) data lebih besar dibandingkan dengan hitungan cawan menggunakan membran filtrasi untuk menganalisa jumlah *coliform* sehingga metode MPN menghasilkan jumlah rata-rata *coliform* lebih besar dari pada metode hitungan cawan. Keberagaman tersebut tidak ditentukan oleh kesalahan analisis (human error) tetapi lebih dipengaruhi oleh dasar perhitungan metode MPN yaitu probabilitas (Gronewold dan Wolpert, 2010).

Pada analisa perhitungan bakteri rumen didapatkan data rata-rata jumlah bakteri rumen (pemfermentasi xylane, starch dan pectin) cenderung sama antara metode CFU maupun MPN. Namun metode hitungan cawan memberikan variabel yang lebih kecil yaitu antara 4-5 kali dari metode MPN sehingga nilai CFU memberikan presisi data yang lebih baik (Kajikawa et al., 1990).

Beberapa literatur menyebutkan hitungan cawan (CFU) menghasilkan data yang lebih presisi. Kemungkinan kurangnya presisi pada MPN ini disebabkan oleh terkumpulnya hasil pada tabel MPN dengan pembulatan (dua angka signifikan) yang cukup besar dibandingkan perhitungan koloni. Variabilitas data metode MPN yang lebih besar dapat diperparah jika kehomogenan sampel tidak diperhatikan dengan baik (sel target masih menggerombol dalam partikel besar sampel) atau adanya tabung positif palsu. Berikut perbedaan anatara MPN dan CFU.

Tabel 5. Konversi MPN ke CFU

Pembeda	Fermentasi tabung berseri (MPN)	Hitungan cawan (CFU)
Objek yang dihitung	tabung positif	setiap koloni
Jenis metode	semi kuantitatif	kuantitatif
Metode yang dilingkupi	metode MPN : 3 seri, 5 seri, 8 seri, atau 10 seri tabung. Metode MPN terotomatisasi.	spread/pour plate pada media agar, membran filtrasi, penanaman pada dry rehydratable film, spiral plate count
Dasar perhitungan	teori probabilitas berdasarkan positif-negatif	satu koloni menggambarkan satu “sel” (unit tumbuh)
Dasar pemilihan pengenceran	frekuensi tabung positif yang “kadang-kadang tetapi tidak selalu”	kisaran jumlah koloni yang memenuhi syarat statistik (25-250, 30-300, <150>)
Media pertumbuhan	broth/cair pada tabung	agar/padat pada cawan
Mikroorganisme target	sel bersifat terpisah seperti <i>coliform</i> , <i>E. coli</i> , <i>enterococci</i> , <i>S. aureus</i> dan <i>Listeria</i>	semua jenis Mikroorganisme tergantung media selektif yang dipakai
Penyebab kesalahan atau positif palsu	bakteri non target yang memiliki ciri metabolisme yang sama	koloni tidak terhitung atau terhitung ganda, antagonisme, kompetisi
Inokulum	10 ml (double strength), 1 ml (single strength)	1 ml (pour plate), 0,1 ml (spread plate)
LOD	< 3 (3 seri) < 1,8 (5 seri) < 0,9 (10 seri)	umumnya 1x10 CFU/g (1 koloni)
Pengaruh waktu inkubasi	tidak mengubah hasil jika diinkubasi melebihi waktu yang ditentukan	koloni dapat terus tumbuh jika terlalu lama diinkubasi

Cukup sulit untuk menjawab pertanyaan tersebut karena terbatasnya sumber. Berikut adalah penjelasan yang diperoleh dari beberapa referensi.

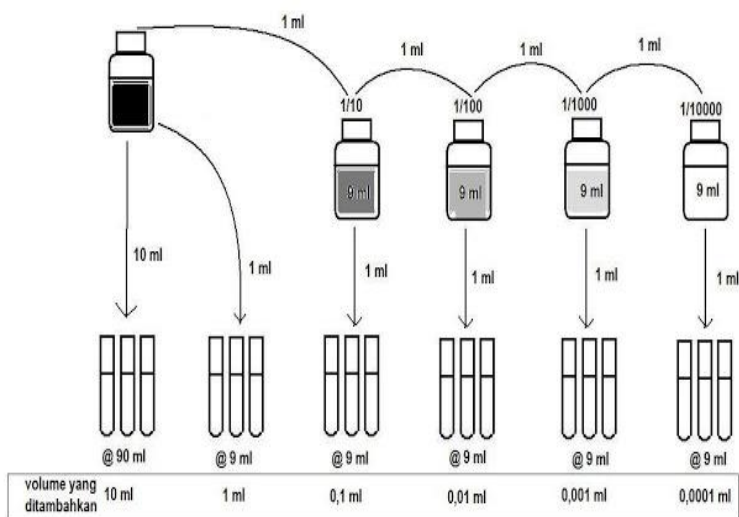
Korelasi metode MPN (colilert dan enterolert) dan CFU (mE agar dan mTEC agar) untuk analisa *E. coli* dan *enterococci* yang diukur pada setiap musim yang berbeda dengan membuat persamaan regresi linier. Hasil uji perhitungan kemudian dianalisa dan dikelompokkan berdasarkan musim pengambilan sampel. Bentuk persamaan dasar tersebut adalah $MPN_{estimates} = a + b \times CFU_{estimates}$, atau bentuk persamaan lainnya yaitu $MPN_{estimates} = a + CFU_{estimates}$ dimana a dan b adalah koefisien regresi. Hasil pengolahan data menunjukkan bahwa MPN dan CFU mempunyai korelasi positif dengan nilai a dan b berbeda-beda di setiap musimnya. Begitu pula dengan nilai r^2 masing-masing persamaan di setiap musimnya. Namun studi ini tidak menjelaskan mengenai suatu rumus universal untuk mengubah satuan MPN ke CFU.

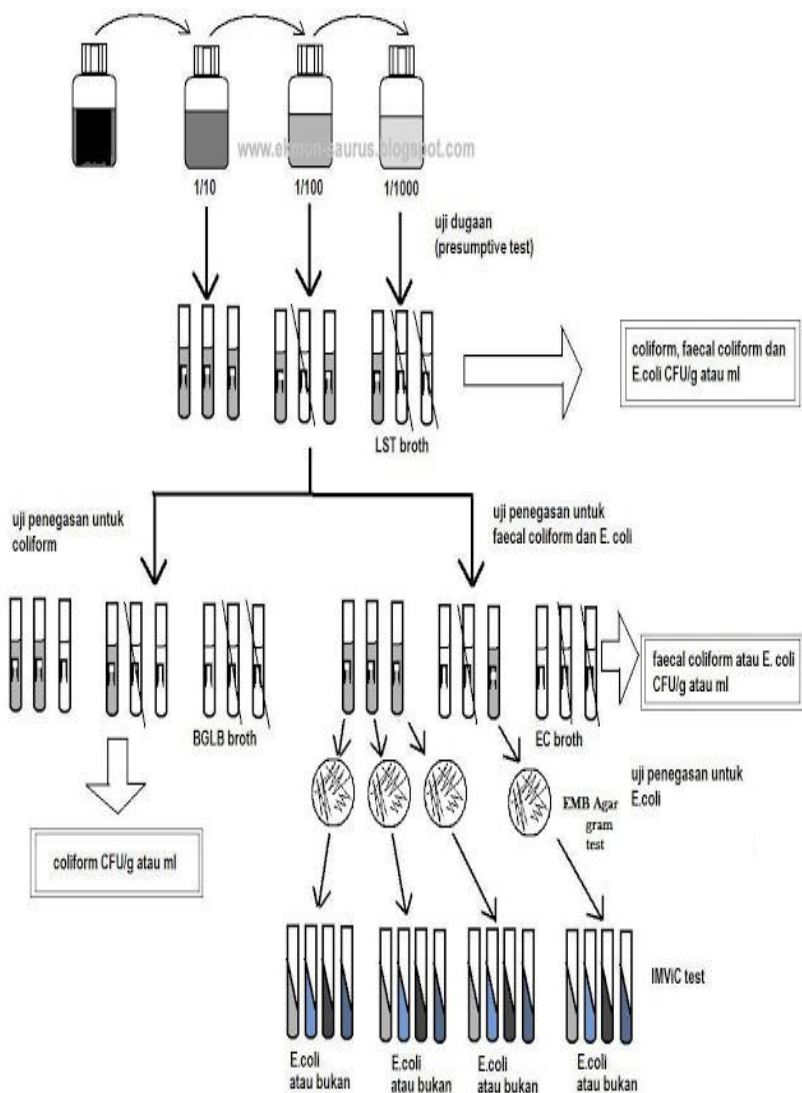
Pada metode AOAC 983.25 (2005) untuk uji total *coliform*, fecal *coliform* dan *E. coli* di pangan menggunakan metode membran filter (Hydrophobic Grid Membrane Filter) disebutkan bahwa hasil akhir jumlah transek membran filter yang ditumbuhi koloni target dapat diubah menjadi MPN dengan rumus $MPN = \{N \log_e [N/(N-x)]\}$, dimana N adalah jumlah total transek (kotak) pada membran filter dan x adalah jumlah transek yang terdapat koloni bakteri target (transek positif). Cara ini mengindikasikan bahwa dari sebaran koloni pada transek membran yang seharusnya dinyatakan sebagai CFU/ml dapat diubah ke MPN/ml. Namun rumus ini hanya telah tervalidasi untuk metode HGMF sesuai rujukan referensi tersebut.

3M (2004) merilis tabel dan rumus konversi untuk data yang diperoleh menggunakan petrifilm EC plate dalam analisa *E. coli* dan *coliform*. Disebutkan bahwa satuan MPN dapat diubah ke CFU atau sebaliknya dengan rumus $(\log CFU) = 0,37 + 0,9 \times (\log MPN)$. Namun rumus ini juga tidak dapat merepresentasikan semua keadaan dan jenis sampel, dan diperlukan verifikasi lebih lanjut untuk aplikasi yang lebih spesifik. Rumus ini diperoleh saat studi prekolaboratif AOAC dengan menggunakan sampel pangan. Sedangkan metode penggunaan petrifilm (CFU) ini sendiri telah tervalidasi oleh AOAC (AOAC, Method 991.14) yang digunakan sebagai rujukan pengenalan

metode dalam rumus tersebut. Namun sama sekali tidak dicantumkan rumus konversi ini dalam metode resmi AOAC 991.14 yang telah diterbitkan begitu pula dengan jurnal sumber metode tersebut (J.AOAC vol.74, p.635). Jadi rumus konversi diatas tidak valid jika digunakan untuk semua sampel dan semua kondisi.

Jadi tidak disarankan untuk tidak mengubah satuan dari CFU ke MPN jika tidak menemukan metode resmi internasional yang mengatur mengenai perubahan itu dengan suatu rumus yang telah tervalidasi. Jika memang antara CFU dan MPN dapat diubah dengan hasil yang pasti, maka akan dapat ditemukan rumus pengkonversinya dengan mudah di referensi metode (konvensional) resmi internasional. Baik MPN atau CFU sebaiknya diperoleh secara terpisah sesuai metodenya masing-masing. Seperti analogi menembak dengan busur panah tidak dapat disamakan dan diubah seperti menembak dengan pistol mengenai tingkat akurasi dan presisinya, karena setiap cara memiliki kelebihan dan kekurangannya sendiri.





Gambar 23. Konversi MPN ke CFU

BAB VIII TEKNIK MEMBRAN FILTER (MF)

A. Pendahuluan

Telah banyak ulasan populer mengenai teknik filtrasi membran yang dikemukakan di berbagai sumber, tetapi masih jarang dijumpai pembahasan secara menyeluruh yang berbahasa Indonesia. Oleh karena itu, posting ini hadir untuk melengkapi kekurangan tersebut. Pada tulisan kali ini, penulis lebih menitikberatkan pembahasan pada teori dan teknik yang sebagian besar diperoleh berdasarkan pengalaman tanpa banyak didukung sumber bacaan. Ulasan yang bukan karya tulis ini berpegang pada nalar analitis proses dan sedikit kepada pengalaman orang lain yang lebih dulu (referensi) sehingga masih sangat banyak membutuhkan penambalan di berbagai bagian dari para ahli. Masukan yang bersifat membangun atau mengkritisi akan dijadikan bahan pertimbangan yang sangat berharga. Tulisan ini lebih bertujuan untuk membantu mikrobiologiwon yang baru mengenal atau belum berpengalaman mengenai teknik filtrasi membran. Semoga dapat membantu.

Banyak metode yang tersedia untuk menghitung mikroba, salah satu metode yang praktis adalah teknik filtrasi membran. Teknik filtrasi membran banyak dipakai di berbagai perusahaan makanan, minuman, farmasi dan kosmetik untuk mengontrol jumlah mikroba pada produk atau tahap potensial lainnya. Teknik filtrasi membran yang juga dikenal sebagai molekular filter adalah metode yang mampu memisahkan antara partikel ukuran tertentu (ukuran sel bakteri) dengan sejumlah besar cairan. Sejarah metode ini dikembangkan oleh Geotz dan Tsuneishi pada tahun 1951. Filtrasi membran diperkenalkan sebagai metode alternatif pengganti MPN yang mampu mengisolasi koloni yang berbeda, sedangkan MPN hanya memperkirakan jumlah yang diindikasikan dengan adanya perubahan pada media

Prinsip teknik filtrasi membran ini adalah dengan menyaring cairan sampel melewati saringan yang sangat tipis dan yang terbuat dari bahan sejenis selulosa. Membran ini memiliki pori-pori berukuran mikroskopis dengan diameter lebih kecil daripada ukuran sel mikroba

pada umumnya. Jadi selama proses penyaringan berlangsung, sel-sel yang terdapat pada sampel akan terjebak pada permukaan membran yang relatif luas. Selanjutnya membran dipindahkan secara aseptis dari peralatan filtrasi ke dalam cawan petri berisi media. Kertas membran ini bersifat solid sehingga dapat menahan sel yang terjebak tetap pada posisinya dan kemudian dapat berkembang tanpa bercampur dengan sel lain yang ikut terjebak juga. Nutrisi yang terdapat pada media akan berdifusi dan terserap kedalam kertas membran sehingga sel-sel yang tersebar acak dan kasat mata itu dapat tumbuh menjadi koloni yang dapat dihitung dengan mata telanjang setelah melewati masa waktu inkubasi tertentu. Bentuk, warna dan sifat lain dari masing-masing koloni tergantung kepada jenis mikroba yang berada pada kertas membran.

Teknik membrane filter memiliki kelebihan membran dibanding teknik lain seperti teknik hitungan cawan dan MPN, diantaranya adalah:

- Dapat menganalisa sampel dengan volume yang besar dalam waktu yang singkat yang dibatasi oleh kekentalan dan kekeruhan cairan sampel.
- Dapat menganalisa sampel dengan jumlah mikroba yang sedikit (peningkatan keakuratan pendeteksian mikroba).
- Inhibitor pada sampel yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba seperti antibiotik, klorin atau zat pengawet dapat terbilas.
- Pada umumnya cawan yang digunakan berukuran kecil (50 mm) sehingga dapat menghemat penggunaan media dan tempat pada inkubator.
- Praktis dalam preparasinya, dapat dilakukan berulang kali penyaringan (melipatgandakan cabang corong) dan reproduibel.
- Sangat cocok untuk mikroba aerob (jika dibandingkan dengan *pour plate*) yang sebagian besar menjadi faktor pengontaminasi yang penting pada produk industri.
- Melalui proses pengeringan tertentu, kertas membran yang telah ditumbuhi koloni dapat dijadikan dokumen atau data permanen demi kepentingan perekaman data.

Disamping memiliki kelebihan, teknik membrane filter juga memiliki kekurangan yaitu:

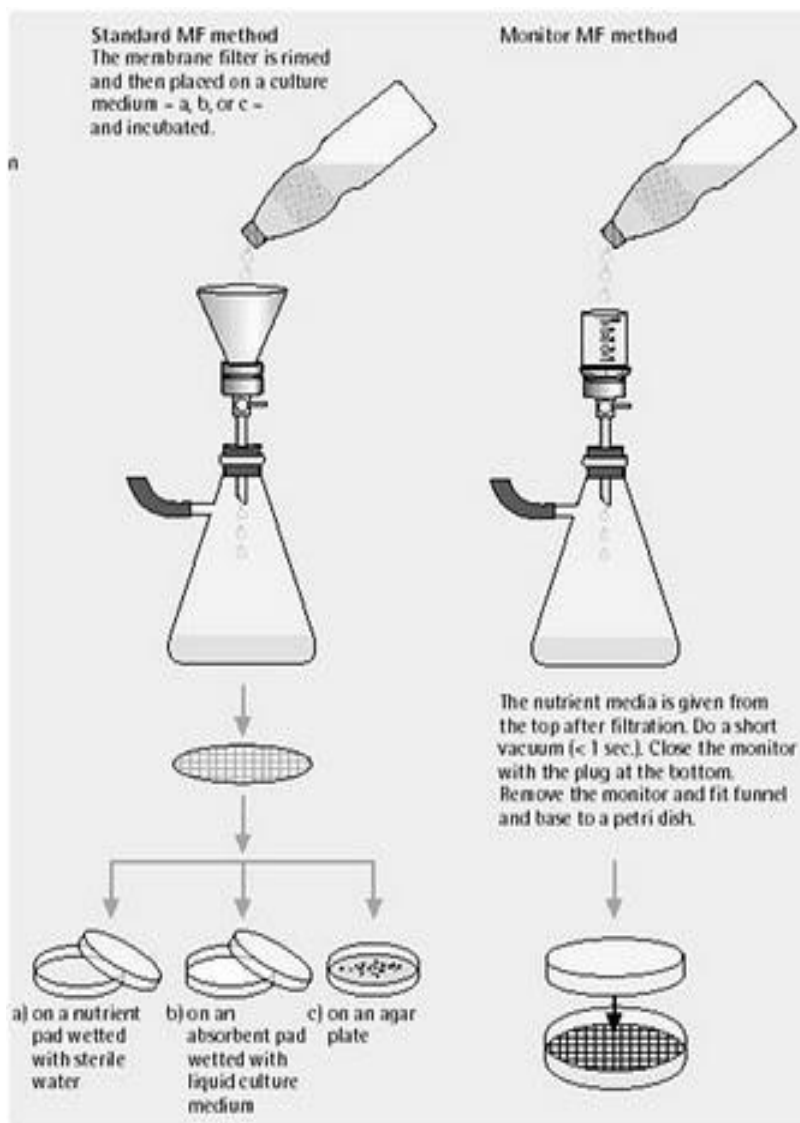
- Kurang cocok untuk menghitung sampel dengan jumlah mikroba yang terlalu pekat walaupun pengenceran dapat dilakukan dengan pengenceran bertingkat.
- Beberapa mikroba yang berdiameter lebih kecil dari pori seperti Rickettsia dan Mycoplasma dapat lolos dari pori kertas membran.
- Kurang praktis untuk menghitung mikroba mikroaerofilik atau anaerob (kecuali dengan perlakuan tertentu).
- Sulit untuk menghitung mikroba pada sampel yang berampas atau memiliki banyak partikel (kekeruhan tinggi) karena partikel tersebut akan menyumbat pori-pori kertas membran.
- Sulit untuk menghitung mikroba pada sampel dengan kekentalan yang tinggi karena membutuhkan waktu penyaringan yang lama.

Selain digunakan untuk menghitung bakteri, teknik filtrasi membran dalam mikrobiologi digunakan juga untuk proses sterilisasi secara mekanis (dengan penyaringan). Prinsipnya sama, yaitu menyaring suatu cairan non steril dengan kertas membran sehingga cairan yang melewatinya akan terbebas mikroba (steril). Pada umumnya bahan yang disterilkan melalui cara ini adalah bahan yang mengandung senyawa tidak tahan suhu tinggi atau tekanan tinggi seperti serum darah, antibiotik, glukosa dll. Perbedaanannya adalah terletak pada kepentingannya. Jika untuk tujuan sterilisasi maka cairan hasil filtrasi harus dijaga kesterilannya dengan menyediakan tempat dan tutup yang steril dan kertas membran tidak ditanam ke dalam media melainkan dibuang. Berikut adalah gambar peralatan filtrasi yang dapat digunakan untuk sterilisasi ataupun menghitung mikroba.

Jika dibandingkan dengan metode penghitungan lain seperti spread plate, pour plate, spiral plate, atau MPN, metode ini memiliki perbedaan yang mencolok yaitu kemampuannya menganalisa sampel dengan volume besar dan keakuratan pada jumlah mikroba yang sedikit. Spread plate memiliki batas volume sampel 0,5 ml sedangkan pour plate 2 ml. Keunggulan inilah yang melatarbelakangi pemilihan metode ini untuk jenis sampel yang cocok. Pada tahun 1978 U.S. EPA merekomendasikan bahwa teknik membran filtrasi digunakan untuk monitoring air karena keunggulannya tersebut.



Gambar 24. Teknik membran filtrasi



Gambar 25. Penanaman membran pada media agar

Terdapat beberapa variasi penyiapan media yang digunakan pada teknik ini tetapi pada prinsipnya sama saja. Perbedaannya yaitu (1). Media agar yang dituang ke cawan petri kosong dan dibiarkan memadat. (2). Media broth yang dituang ke absorbent pad (semacam kertas isap). (3). Air steril yang ditambahkan ke absorbent pad yang mengandung media yang dikeringkan (dehydrated) yang produknya disebut Nutrient Pad Set (NPS). (4). Media yang ditambahkan dari atas setelah filtrasi yang disedot dengan pompa vakum yang disebut dengan metode filtrasi membran monitor. Metode yang terakhir ini lebih tidak time-consuming karena hanya perlu ditambahkan sampel dan media tanpa merakit peralatan filtrasi.

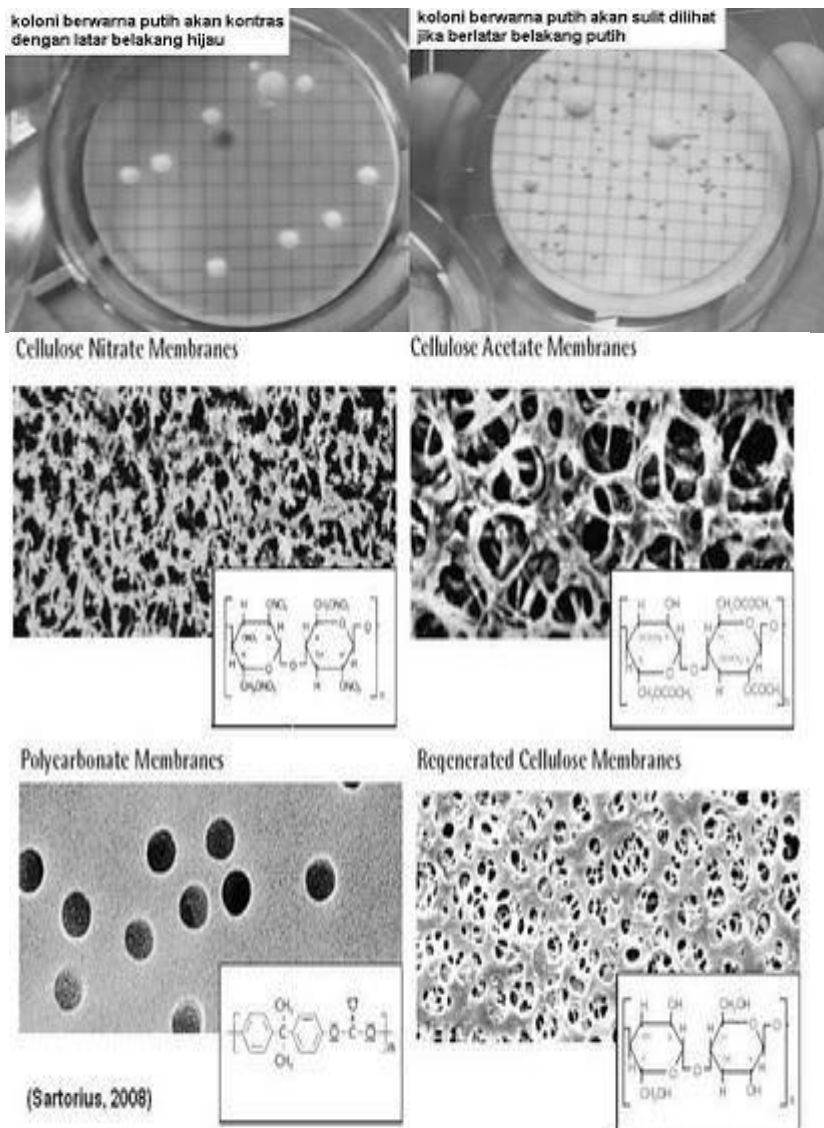
Banyak tersedia jenis media pertumbuhan untuk metode filtrasi membran dengan tujuan menghitung bakteri heterotrof (total count) seperti MTGE, m-HPC Agar, Standard Methods Agar dll. Selain itu untuk menghitung bakteri kelompok tertentu atau mikroba jenis tertentu membutuhkan media pertumbuhan yang spesifik seperti endo, chromocult, untuk *coliform*. Berikut beberapa jenis media pertumbuhan berdasarkan tujuannya beserta waktu dan suhu inkubasinya.

Total Count:

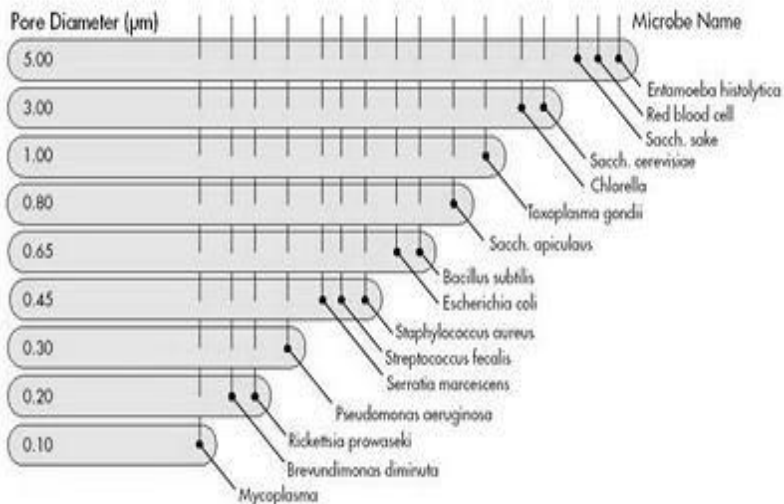
- R2A (48-72 jam pada $35 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ atau 5-7 hari pada $20-28^{\circ}\text{C}$),
- Yeast extract (44 ± 4 jam pada $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$ atau 68 ± 4 jam pada $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$)
- Standard TTC (48 jam pada 30°C).
- Standard methods agar ($48-72 \pm 2$ jam pada 35°C)
- m-HPC agar ($48-72 \pm 2$ jam pada 35°C)
- Soybean-Casein Digest Medium ($24-72$ jam pada $30^{\circ}\text{C}-37^{\circ}\text{C}$)
- *Coliform* dan *E. coli*:
- Chromocult (24 jam pada $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$)
- Endo (24 jam pada 37°C)
- Teepol ($18-24$ jam pada 37°C)
- MacConkey ($18-24$ jam pada 37°C)
- Tergitol TTC (20 ± 4 jam pada 37°C)
- Yeast and molds:
- Schaufus-Pottinger ($2-3$ hari pada $28-30^{\circ}\text{C}$)

- Sabouraud (2–5 hari pada 25–30°C)
- Wort (2–3 hari pada 25°C)
- Malt extract (2–3 hari pada 25–30°C)
- Bakteri fekal :
- Azide (24–48 jam pada 37°C)
- Bismuth-Sulfite (18–48 jam pada 37°C)
- Bakteri non fekal:
- Chapman (48 jam pada 37°C)
- Cetrimide (48 jam pada 37°C)

Ketepatan pemilihan kertas membran juga perlu dipertimbangkan demi kenyamanan mata dalam menghitung. Mikroba yang dimungkinkan tumbuh sebaiknya mempunyai kekонтрасan dengan warna kertas membran sebagai latar belakang. Beberapa warna umum kertas membran yang tersedia adalah hijau, putih, abu-abu, hitam dengan warna garis-garis (grid) kontras dengan warna kertas membran. Setiap warna memiliki tujuannya masing-masing. Warna hijau cocok untuk menghitung mikroba yang memiliki koloni putih, transparan, atau berwarna. Lagipula sangat jarang terdapat bakteri yang memiliki warna koloni hijau, karena sebagian besar bakteri yang menyebabkan pembusukan adalah heterotrof, bukan autotrof (yang memiliki klorofil) kecuali koloni yang tumbuh pada media yang diberi zat warna atau indikator hijau seperti schauffus pottinger m-green yeast and mold media. Jadi warna hijau adalah warna yang cocok untuk total count dan dengan media tanpa zat warna. Kertas membran warna gelap (hitam) cocok untuk menghitung koloni yeast dan mold yang sebagian besar berwarna terang. Kertas membran warna putih digunakan untuk menghitung koloni yang tumbuh pada media yang ditambah pewarna (dye), misalnya kertas membran putih diletakkan pada media endo berwarna merah muda, maka *E. coli* (*green metallic sheen*) yang terdeteksi akan terlihat nyata.



Kunci keunggulan dari teknik filtrasi membran terletak pada keistimewaan kertas membran yang memiliki pori-pori lebih kecil dari benda yang disaring dan hanya mempunyai tebal 0,1 mm ini. Ukuran pori-pori kertas membran yang tersedia adalah 0,2 μm , 0,45 μm , 0,65 μm , 0,8 μm , dan 1,2 μm . Jika tujuan analisa untuk menyaring sel bakteri, maka digunakan kertas membran dengan pori 0,45 μm , tapi jika bertujuan untuk menyaring spora jamur dan sel ragi maka cukup dengan pori 0,65 μm . Pemilihan pori kertas membran yang cocok berkorelasi dengan rata-rata diameter sel mikroba yang diinginkan. Umumnya kertas membran terbuat dari senyawa selulosa, misalnya selulosa nitrat, selulosa asetat, campuran ester selulosa nitrat dan selulosa asetat, selulosa murni, atau polimer lain seperti polikarbonat (polimer plastik), poliamida dll. Setiap bahan memiliki kelebihan tersendiri dan fungsi yang lebih khusus. Bahan yang paling umum dipakai dalam mikrobiologi adalah selulosa nitrat. Bahan kertas membran dari selulosa bersifat hidrofilik, rusak jika terkena zat volatil seperti alkohol dan tidak tahan suhu tinggi. Berikut adalah hubungan antara ukuran pori kertas membran dengan ukuran sel berbagai macam jenis mikroba.

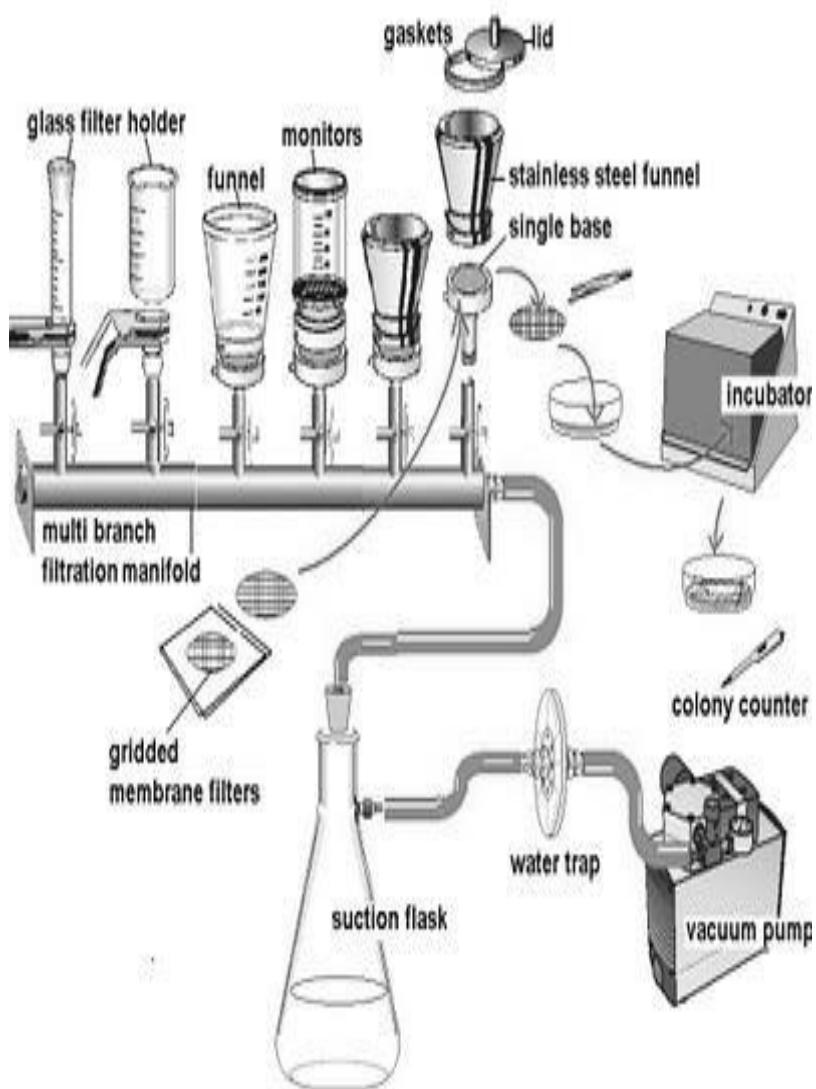


Gambar 27. Hubungan antara ukuran pori kertas membran dengan ukuran sel berbagai macam jenis mikroba

B. Pengenalan peralatan pada teknik filtrasi membran

Pada dasarnya alat dan bahan utama yang dibutuhkan untuk teknik filtrasi membran adalah:

- Corong – untuk menampung cairan sampel
- Tutup corong – untuk mencegah kontaminasi sekunder atau kontaminasi dari udara
- Dasar corong – sebagai dasar penyangga corong dan tempat peletakan kertas membran
- Cawan petri dan media – sebagai sumber nutrisi
- Labu penghisap/penampung – tempat untuk menampung cairan hasil penyaringan
- Pompa vakum – alat untuk menurunkan tekanan
- Selang/pipa – sebagai penyalur cairan atau udara antar bagian
- Kertas membran – alat penyaring
- Pinset – menjepit kertas membran
- Dan alat lain untuk mendukung proses kerja aseptik, misal produk dari Sartorius dapat terdiri dari:
 - Stainless steel funnel (corong).
 - Single base/filter base (dasar corong).
 - Lid dan gasket (tutup dan karet).
 - Manifold (filtrasi bercabang).
 - Suction flask (labu pengumpul).
 - Gridded membrane filters (kertas membran berskala).
 - Water trap (alat pencegah masuknya air ke dalam pompa vakum).

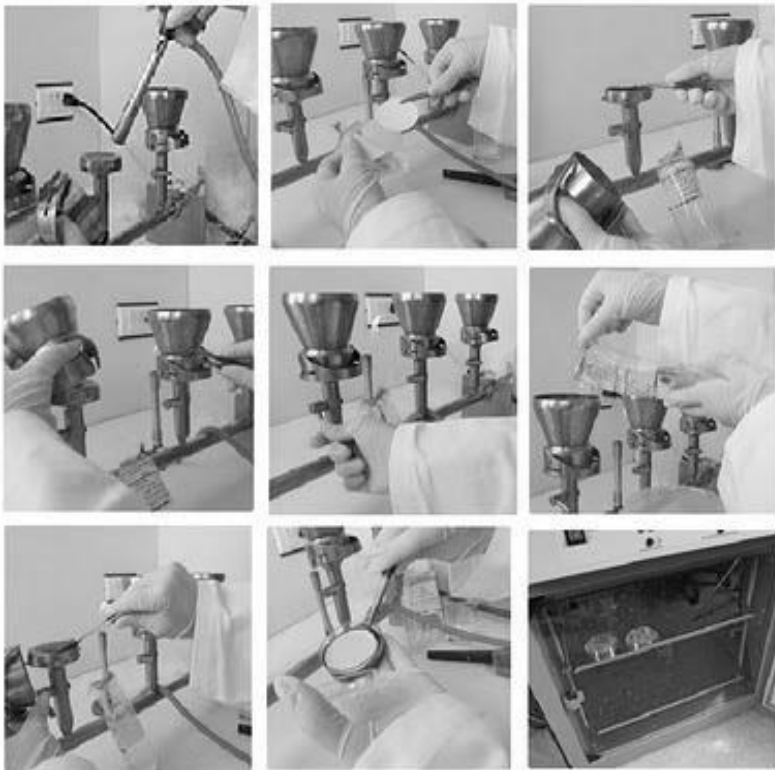


Gambar 28. Rangkaian alat dengan membran filter

C. Cara kerja

Tahap-tahap prosedur teknik filtrasi membran adalah:

1. Sterilisasi dasar corong dan corong menggunakan bunsen
2. Mengeluarkan kertas membran dari pembungkus
3. Meletakkan kertas membran pada dasar corong.
4. Merakit peralatan dengan memasang corong pada dasar corong.
5. Membuka
6. Menuang sampel dan menyalakan pompa vakum.
7. Melepaskan corong
8. Mengangkat kertas membran ke dalam cawan.
9. Menginkubasi cawan pada suhu dan waktu yang tepat.



Gambar 29. Tahap-tahap prosedur teknik filtrasi membran

1. *Sterilisasi alat*

Setelah prosedur permulaan kerja aseptik dilaksanakan, alat-alat filtrasi seperti manifold, funnel, single base, dan lid (semuanya terbuat dari stainless steel) sebaiknya disterilisasi terlebih dahulu. Cara sterilisasi yang utama dapat menggunakan autoklaf, tetapi jika dipakai berulang kali maka dapat disterilisasi dengan dibakar. Caranya yaitu dapat dibakar langsung dengan pembakar bunsen atau disemprot alkohol terlebih dahulu lalu dibakar. Diharap sangat hati-hati jika melakukan sterilisasi dengan cara ini. Terdapat alternatif lain yang lebih aman yaitu hanya disemprot alkohol saja atau direndam dalam air panas, tapi cara ini lebih rendah tingkat sterilitasnya dibanding dengan dibakar. Bagian-bagian yang lebih diutamakan kesterilannya adalah muka single base/filter base yang akan ditemplei kertas membran dan bagian dalam funnel yang akan kontak dengan sampel.

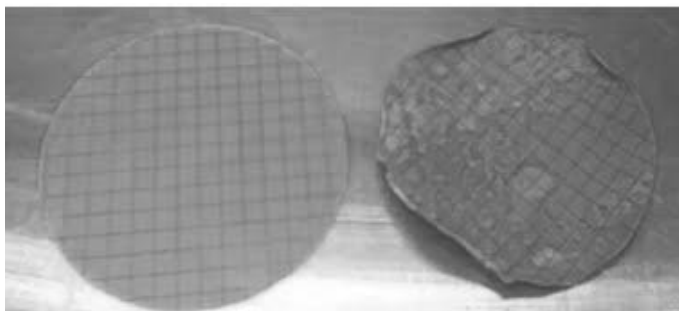
Membuat media atau menambahkan air pada NPS

Seperti yang telah diuraikan diatas, preparasi media yang sesuai dapat dipilih sesuai dengan kebutuhan dan keadaan. Hasil penuangan media agar seharusnya memiliki permukaan yang rata supaya kertas membran dapat merekat sempurna di permukaan agar. Penambahan air steril atau media cair pada absorbent pad atau Nutrient Pad Set (NPS) mengikuti petunjuk produk. Volume media yang cukup dicirikan dengan adanya sedikit lingkaran air atau media yang lebih disekeliling pad yang mendukung suplai air selama masa inkubasi. Selain itu hal ini dapat mempermudah menempelnya kertas membran di permukaan pad yang basah. Jumlah media cair yang berlebih dikhawatirkan dapat mengalir ke permukaan kertas membran dan menghasilkan koloni spreader.

2. *Merakit peralatan*

Saat merakit peralatan filtrasi sebaiknya menggunakan penjepit atau semacamnya untuk mengurangi resiko kontaminasi dan panas setelah sterilisasi. Jika dengan tangan pastikan kebersihan tangan dengan alkohol. Terlalu ketat penjepitan kertas membran dapat mengakibatkan sobeknya kertas membran saat diangkat dan menimbulkan bekas cekungan yang dalam. Pastikan semua peralatan (corong dan dasar corong) benar-benar bebas dari alkohol karena

sedikit alkohol dapat mengubah integritas struktur kertas membran sehingga menjadi mengkerut atau melengkung.



Gambar 30. Perubahan integritas struktur kertas membran oleh alkohol

3. Melepas kertas membran dan memasangnya

Mengingat kertas membran yang digunakan bersifat hidrofilik maka dasar corong yang kering (setelah sterilisasi panas) sebaiknya dibasahi dengan air steril supaya kertas membran lebih mudah ditempelkan. Hal ini seperti menempelkan kertas buram pada meja yang berair.

4. Menuang atau menambahkan sampel

Cairan sampel dapat dituang langsung dari botol atau wadah jika volumenya cukup besar, tetapi jika dibutuhkan misalnya sampel 1-10 ml disarankan menggunakan mikropipet non-fix (1-10 ml) supaya volume yang terambil benar-benar presisi. Biasanya pada corong telah tertera skala volume. Lebih baik tidak menggunakan spoon (fix volume; 5ml, 10ml, 20ml) dalam penuangan sampel karena lebih beresiko untuk bertambah atau berkurangnya volume sampel. Semakin kecil pengambilan sampel dengan spoon maka semakin tidak akurat volume yang terambil. Sebaiknya menghindari pengambilan sampel dibawah 1 ml karena dapat mempertinggi tingkat kesalahan penuangan (penyebaran acak atau kehomogenan sel dalam sampel kurang seragam). Biasanya jarang dijumpai persyaratan yang memerintahkan

pengambilan sampel dibawah 1 ml karena lebih dipilih diencerkan terlebih dahulu lalu diambil volume sampel yang cukup besar atau menggunakan penanaman pour plate atau spread plate. Jika sampel yang ditambahkan sedikit dan direncanakan tidak akan dibilas maka penuangan harus langsung mengenai kertas membran, jangan dialirkan melewati corong. Jika sampel yang ditambahkan terlalu banyak (misalnya 500 ml) dan bila tersaring semua dimungkinkan dapat menyebabkan tersumbatnya pori kertas membran, maka penuangan sampel dapat dibagi menjadi dua atau tiga pada corong yang berbeda sehingga perhitungannya tetap dijumlahkan dari seluruh cawan yang ada.

5. Penyedotan pompa vakum

Pompa vakum bekerja mengurangi tekanan udara dalam selang dan bagian dalam peralatan filtrasi sehingga air sampel pada corong tersedot dan ditampung pada labu pengumpul. Perlu diperhatikan bahwa saat saklar pompa dimatikan, tekanan dalam ruang tertutup itu masih lebih rendah dari pada ruangan sehingga udara masih tetap tersedot walaupun semua sampel telah berada pada labu pengumpul. Selain itu biasanya tekanan di dalam masih tetap rendah saat semuanya selesai dan mengakibatkan tersedotnya udara yang menimbulkan bunyi (proses menyamakan tekanan) saat kertas membran diangkat dari dasar corong. Jika pada manifold dilengkapi dengan tuas (semacam kran) untuk membuka dan menutup udara, maka lebih baik udara ditutup terlebih dahulu kemudian dibuka setelah kertas membran diletakkan pada cawan supaya tekanan menjadi sama.

6. Pembilasan corong

Pembilasan corong dengan air steril dilakukan untuk memastikan tidak ada mikroba yang tidak tersaring terutama untuk analisa dengan kisaran jumlah mikroba yang sedikit walaupun hal ini meningkatkan resiko kontaminasi dari air steril tersebut. Pembilasan lebih disarankan pada penuangan volume sampel yang sedikit, misalnya 5 ml. Selain itu penambahan air steril dapat bertujuan untuk mengencerkan kekentalan sampel. Volume air steril yang ditambahkan tidak mempengaruhi hitungan atau pengenceran apapun yang dilakukan dan jumlahnya hanya berhubungan dengan seberapa efisien

untuk membilas sel-sel yang masih menempel pada permukaan corong. Biasanya ditambahkan 20 ml air steril atau larutan fisiologis.

7. Peletakan kertas membran pada cawan

Supaya udara tidak terjebak diantara kertas membran dan pad maka penempelan atau peletakan kertas membran dilakukan dengan hati-hati dari ujung. Jika gelembung udara terbentuk maka sebaiknya dihilangkan dengan pinset.

8. Inkubasi cawan

Cawan dengan absorbent pad sebaiknya diinkubasi dengan posisi absorbent pad dibawah (jangan dibalik). Hal ini bertujuan supaya kelebihan air (media) tidak turun ke tutup cawan yang dapat mengurangi pasokan media ke absorbent pad atau mengakibatkan kontaminasi, tujuan yang kedua agar kertas membran tidak jatuh saat media sudah mulai mengering terutama untuk inkubasi yang membutuhkan waktu sehari-hari.

9. Sanitasi peralatan

Sanitasi perlu dilakukan terutama setelah menganalisa dengan sampel yang mengandung gula atau nutrisi lain. Biofilm yang dapat terbentuk pada peralatan filtrasi, selang dan labu pengumpul dapat meninggikan resiko kontaminan saat dipakai. Pembilasan dengan air atau agen pembersih bisa dilakukan dengan melewatkannya ke dalam jalur yang dilewati sampel atau dapat juga dicuci secara manual.

10. Hasil inkubasi

Hasil pertumbuhan yang baik dicirikan dengan pertumbuhan koloni yang acak tersebar merata, tidak ditemukan kontaminan, dan memenuhi kisaran hitung per cawan. Jumlah maksimal koloni per cawan yang diizinkan menurut ASTM (American Standard Testing and Methods) pada metode filtrasi membran adalah 20-80 koloni. Hal ini menyesuaikan dengan ukuran kertas membran yang kecil (47mm) lain halnya bila mengingat batas atas kisaran hitung (300 koloni) karena kisaran ini untuk cawan berdiameter 9 cm. Sedangkan menurut HPA

(Health Protection Agency) dengan volume sampel 100 ml, jika tidak ada pertumbuhan maka dilaporkan sebagai 0 CFU/100 ml dan jika terdapat lebih dari 100 koloni maka dilaporkan $>100\text{CFU}/100\text{ ml}$. Jadi batas tertinggi perhitungan adalah 100 koloni dan batas terendah adalah <1 (0). Cara menghitung koloni adalah dengan memanfaatkan transek yang terdapat pada kertas membran dengan pola zig-zag (seperti gambar) dengan Colony Counter dengan perbesaran 4x.

D. Permasalahan yang umum terjadi

Pertumbuhan spreader atau koloni yang melebar

Seharusnya setelah filtrasi selesai semua cairan sampel telah tersedot dari kertas membran tetapi beberapa faktor dapat menyebabkan air sedikit tertinggal di permukaan kertas membran. Lapisan air yang tipis saja dapat menyebarkan sel yang sedang memperbanyak diri dan saat air tersebut kering selama proses inkubasi, sel-sel (dari satu CFU) telah tersebar dan menghasilkan koloni yang spreader. Koloni yang melebar karena lapisan air ini dapat menutupi sebagian atau seluruh permukaan kertas membran tergantung banyak sedikitnya air dan seberapa cepatnya menguap. Pola lain yang sering dijumpai adalah adanya lapisan tipis air yang berkumpul pada cekungan (bagian yang tidak rata dari kertas membran) akibat perlakuan tertentu atau sebab lain. Misalnya, ditemui koloni yang tumbuh pada bekas penjepitan corong atau koloni yang mengikuti pola garis-garis/grid (bentuk ini bukan karena sifat tepi koloni yang seperti itu). Hasil pertumbuhan spreader dapat dihindari dengan memastikan cairan benar-benar kering dari kertas membran setelah difiltrasi atau jangan menambahkan media cair terlalu banyak.

TNTC (Too Numerous To Count)

Kondisi terlalu banyak untuk dihitung menggambarkan bahwa semakin besar kesalahan saat menghitung jika tetap dipaksakan untuk menghitung. Hal ini mungkin bukan suatu kesalahan jika suatu requirement memerintahkan penuangan sampel sebanyak 50 ml lalu dihasilkan koloni TNTC. Namun lebih baik dihasilkan cawan yang memenuhi kisaran hitung sehingga dapat diketahui jumlah mikroba secara pasti dan terpercaya berdasarkan statistik. Semakin banyak koloni yang tumbuh maka kompetisi mendapatkan nutrisi dan ruang

juga semakin terbatas. TNTC dapat dihindari dengan mengencerkan sampel atau menyedikitkan volume sampel.

Terdapat gelembung pada kertas membran

Gelembung yang terperangkap saat meletakkan kertas membran dapat membiaskan jumlah koloni yang sebenarnya. Kontak kertas membran dengan media sangat berpengaruh kepada distribusi nutrisi sehingga pertumbuhan koloni akan lebih lambat atau tidak ada sama sekali. Hasil ini jelas tidak diinginkan dan dapat diatasi dengan menghilangkan udara yang terperangkap saat penempelan kertas membran pada cawan.

Membran terangkat dan terlipat

Kertas membran yang terlipat terjadi karena kesalahan saat meletakkan pada cawan dengan pinset. Proses penggeseran kertas membran dapat dilakukan dengan menariknya bukan mendorongnya. Lain halnya dengan kertas membran yang terangkat, kejadian ini dimungkinkan karena sedikitnya cairan media sehingga saat kertas membran diletakkan tidak semua permukaan terbasahi kemudian selama waktu inkubasi, kertas membran mudah kering pada bagian yang mengandung air lebih sedikit. Sebab lain adalah karena terdapat sedikit alkohol pada dasar corong sehingga dapat menggulungkan kertas membran.

Koloni tidak merata (terkumpul di pinggir/disuatu tempat)

Koloni yang terkumpul di pinggir kertas membran mengikuti alur bekas corong dikarenakan sampel yang ditambahkan sedikit. Pada saat penambahan sampel (misalnya 1 ml), air yang memiliki daya adhesi akan cenderung untuk menempel di sudut corong dan membawa sebagian besar sel-sel mendekati corong. Bila tidak dibilas dengan air steril maka hasil pertumbuhan koloninya menjadi demikian. Jika menjumpai pola pertumbuhan koloni yang terkumpul disuatu tempat dan tidak tersebar merata maka dikarenakan sampel kurang homogen. Semua permasalahan ini dapat diatasi dengan membilasnya setelah difiltrasi.

Terdapat pertumbuhan di luar bekas corong dan bekas pinset

Kontaminasi yang dapat terdeteksi pada metode ini umumnya berada diluar bekas corong atau bekas pinset. Jika koloni kontaminan tumbuh pada kertas membran dalam area corong maka tidak dapat dibedakan dengan sel yang berasal dari sampel. Tidak sempurnanya sterilisasi pinset dan bagian bawah corong yang kontak dengan kertas membran dapat menyebabkan kontaminasi ini.

Inkubasi terlalu lama

Penentuan waktu inkubasi umumnya telah disesuaikan berdasarkan jenis media dan mikroba yang dimungkinkan tumbuh. Namun bila terjadi proses inkubasi yang terlalu lama maka pertumbuhan koloni menjadi terlalu besar dan bersinggungan sehingga mempersulit perhitungan. Inkubasi yang sesuai menghasilkan koloni-koloni yang diameternya cukup terlihat dan tersebar merata. Jangan menghitung sebelum waktunya (saat koloni masih terlalu kecil) karena dikhawatirkan terdapat beberapa koloni yang belum terlihat tumbuh.

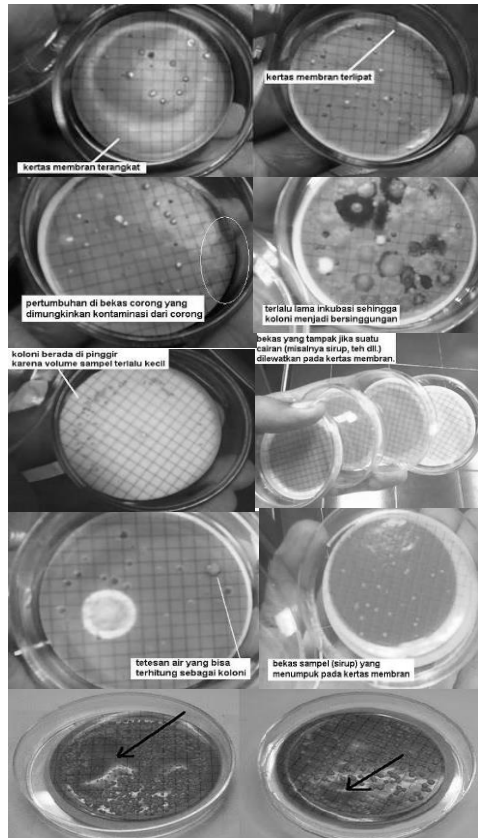
Cairan sampel yang kental sulit tersedot

Sering kali sampel yang kekentalannya atau kekeruhannya tinggi menyebabkan macet (sampel tidak dapat tersedot lagi) dan memperberat kerja pompa vakum karena tekanan didalam ruang terlalu kecil. Cairan yang kental seperti sirup akan sulit mengalir melewati pori membran karena zat terlarutnya lebih besar dari pada pelarutnya. Salah satu cara menanggulangnya adalah dengan memperhitungkan jumlah maksimal sampel yang ditambahkan atau ditambah air steril. Penambahan berapapun air steril tidak mempengaruhi perhitungan koloni atau pengenceran yang dilakukan karena diasumsikan air steril tidak mengandung bakteri. Jika sampel sudah benar-benar tidak dapat lagi tersedot maka proses filtrasi gagal dan sebaiknya diulang dengan menyesuaikan sampel. Cairan yang kental sering sulit tersedot sampai habis dan masih meninggalkan sedikit lapisan dan dikhawatirkan menghasilkan koloni spreader.

Tetes air yang jatuh

Bagi mata yang kurang terlatih tetesan air yang mirip koloni dapat menipu, apalagi jika jumlah mikroba yang tumbuh diperkirakan

sedikit. Biasanya pengembunan yang terjadi pada tutup cawan dapat mengalir kesamping saat cawan dalam posisi miring, tetapi (entah bagaimana) adakalanya tetesan jatuh pada kertas membran. Namun terdapat jenis bakteri yang mempunyai bentuk koloni seperti tetesan air, untuk memastikannya dapat disentuh dengan pinset.



Gambar 31. Pertumbuhan koloni yang bermasalah

DAFTAR PUSTAKA

- Adams, Martin R. and Maurice O. Moss. 2008. Food Microbiology 3rd Edition. RSC Publishing, Cambridge.
- Andersen, Ariel. 1958. New Sampler for the Collection, Sizing, and Enumeration of Viable Airborne Particles. Journal of Bacteriological 76. P.471-484.
- Bacteriological Analytical Manual. 2003. Chapter 1, Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate.
- Blodgett, Robert. 2010. BAM Appendix 2: Most Probable Number from Serial Dilutions. Bacteriological Analytical Manual.
- BSN, 2006. SNI 01-2332.1-2006, Cara Uji Mikrobiologi- Bagian 1 : Penentuan *Coliform* dan *Escherichia coli* pada Produk Perikanan, ICS.67.120.30. Badan Standardisasi Nasional.
- Collins, C. H., P. M. Lyne, J. M. Grange, J. O. Falkinham III. 2004. Microbiological Methods, 8th Editions. Oxford University Press, New York.
- Forsythe, S.J. dan P.R. Hayes. 1998. Food Hygiene, Microbiological and HACCP. Aspen Publication.
- Jay, M. James. 2000. Modern Food Microbiology, 6th edition. An Aspen Publication, Gaithersburg.
- Lattuada, C.P. dan B.P. Dey. 1998. Microbiology Laboratory Guide Book 3RD Edition, Chapter 1 Sample Preparation for Meat, Poultry and Pasteurized Egg Products. USDA/FSIS.
- Pepper, I.L. and C.P. Gerba. 2004. Environmental Microbiology A Laboratory Manual, Second Edition. Elsevier Academic Press, New York.

- Pradhika Indra E, 2011. Mikrobiologi Praktik. <http://ekmon-saurus.blogspot.com/2009/05/bekerja-tanpa-kontaminasi-dasar-tehnik.html> (diakses pada tanggal 26 maret 2014).
- SNI. 2006. SNI (Standard Nasional Indonesia) 01-2332.1.2006, Cara Uji Mikrobiologi-Bagian 1 : Penentuan *Coliform* dan *Escherichia coli* pada Produk Perikanan. BSN (Badan Standardisasi Nasional).
- Spencer, John F.T., and A.L. Ragout de Spencer. 2001. Method in Biotechnology Vol 14 : Food Microbiology Protocols, Humana Press, New
- Suhardi, S.H., Koesnandar, D. K. Indriani, H. Arnaldo. 2008. Biosafety: Pedoman Keselamatan Kerja di Laboratorium Mikrobiologi dan Rumah Sakit. PT. Multazam Mitra Prima.
- Thrasher, S., G. H. Richardson. 1980. Comparative Study of the Stomacher and the Waring Blender for Homogenization of High-fat Dairy Foods. Journal of Food Protection 1980, Vol.43 No.10 p.763-764.
- Tortora, G.J., B.R. Funkee and C.L. Case. Microbiology An Introduction. Addison Wesley Longman Inc., New York.
- Wallace, H.A., dan T.S. Hammack. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. Bacteriological Analytical Manual, Edition 8, Revision A, Chapter1.

RIWAYAT HIDUP PENULIS



Hafsan. Putri keenam dari delapan bersaudara yang dilahirkan dari pasangan bersuku bugis, Muhammad Sapile dan Hasnawiah di Sabah, Malaysia pada tanggal 12 September 1981. Menamatkan studi sarjana pada program studi Biologi Fakultas MIPA Universitas Negeri Makassar pada tahun 2004. Tahun 2005 dipersunting oleh seorang putra bugis, Muhammad Nur Lajo, serta dianugerahi tiga putra (i). Selepas menyelesaikan studi S1, penulis mengabdikan diri sebagai Dosen dan pengelola pada jurusan Biologi FMIPA Universitas Cokroaminoto Palopo (2004-2009). Tahun 2005-2007 mendapat kesempatan untuk melanjutkan studi S2 dengan beasiswa BPPS pada jurusan Pendidikan Biologi Program Pasca Sarjana Universitas Negeri Malang. Pada akhir tahun 2009 penulis melanjutkan karir sebagai dosen tetap pada Biologi Fakultas sains dan Teknologi UIN Alauddin Makassar. Pada Tahun 2013 mendapat izin belajar ke jenjang S3 pada Program Studi Ilmu Pertanian Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin dengan konsentrasi Mikrobiologi. Sebagai tenaga pengajar, mata kuliah yang diampu adalah Bioteknologi, Mikrobiologi Umum, Mikrobiologi Analitik, serta Dasar-dasar Fermentasi dan Biostatistik. Selain Mengajar, penulis aktif melakukan penelitian dan dan pengabdian kepada masyarakat serta publikasi baik ditingkat regional, nasional maupun internasional. Buku teks yang telah ditulis dan diterbitkan adalah Mikrobiologi Umum, Pengantar Bioteknologi, dan Rancangan percobaan.



ALAUDDIN UNIVERSITY PRESS

